

# **DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Caracterización de nuevas rutas reguladoras del metabolismo lipídico en adipocitos. Alteraciones en obesidad**

**Characterization of novel pathways in the regulation of lipid metabolism in adipocytes. Alterations in obesity.**

**Directores:**

**Prof. Dra. María del Mar Malagón**

**Prof. Dra. Rocío Guzmán Ruiz**

Alejandro Fernández Vega

Córdoba, 06 Octubre 2020

TITULO: *CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS RUTAS REGULADORAS DEL  
METABOLISMO LÍPIDICO EN ADIPOCITOS. ALTERACIONES EN  
OBESIDAD*

AUTOR: *Alejandro Fernández Vega*

---

© Edita: UCOPress. 2020  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---

# DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Caracterización de nuevas rutas reguladoras del metabolismo lipídico en adipocitos. Alteraciones en obesidad**

**Characterization of novel pathways in the regulation of lipid metabolism in adipocytes. Alterations in obesity.**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Alejandro Fernández Vega**, Licenciado en Ciencias Ambientales, para optar al grado de **Doctor en Biomedicina**.

Los Directores

**Prof. Dra. María del Mar Malagón**

Catedrática de Biología Celular de la  
Universidad de Córdoba

**Prof. Dra. Rocío Guzmán Ruiz**

Investigadora Postdoctoral de la  
Universidad de Córdoba

En Córdoba, a 6 de Octubre de 2020







UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



**DPTO. DE BIOLOGÍA CELULAR,  
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

**Dña. María del Mar Malagón Poyato** (Catedrática de Biología Celular), y **Dña. Rocío Guzmán Ruiz** (Investigadora Postdoctoral y Profesora de Biología Celular), ambos pertenecientes al Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba,

**INFORMAN**

Que D. **ALEJANDRO FERNÁNDEZ VEGA**, Licenciado en Ciencias Ambientales, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado **“CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS RUTAS REGULADORAS DEL METABOLISMO LIPÍDICO EN ADIPOCITOS. ALTERACIONES EN OBESIDAD.”**, que, bajo nuestro juicio, reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Y para que conste, firmamos el presente documento en Córdoba, 29 de Septiembre de 2020.

Firma del/de los director/es

Fdo.: Prof. **Dra. María del Mar Malagón**

Fdo.: Prof. **Dra. Rocío Guzmán Ruiz**





**TÍTULO DE LA TESIS:** Caracterización de nuevas rutas reguladoras del metabolismo lipídico en adipocitos. Alteraciones en obesidad.

**DOCTORANDO/A:** Alejandro Fernández Vega

### **INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, el Doctorando Alejandro Fernández Vega ha superado los objetivos científicos y formativos planteados al comienzo de la misma. Además, ha desarrollado y puesto a punto técnicas experimentales que no solo le han ayudado a afrontar preguntas conceptuales adicionales y ampliar su campo de conocimiento, sino que también han sido de una gran utilidad para el grupo de investigación. Los resultados obtenidos de este trabajo le han permitido caracterizar por primera vez el lipidoma del tejido adiposo subcutáneo mediante la técnica MALDI-Imaging (*matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry*) lo que ha llevado a establecer la abundancia relativa de los lípidos presentes en el tejido adiposo, tanto en modelos murinos como en humanos, en situaciones de obesidad y resistencia a insulina. Además, la aplicación de esta técnica ha permitido determinar la distribución espacial de dichos lípidos mediante la correlación de los datos de MALDI-Imaging con la información histológica del tejido adiposo en ambos modelos. El trabajo realizado por el doctorando ha dado lugar a la publicación de un artículo científico en la revista *Talanta* (2020). Además, fruto de la colaboración con otros grupos de investigación en la puesta a punto de la técnica se ha publicado también otro trabajo relacionado con su Tesis Doctoral en la revista *Talanta* (2018). También, gracias a la participación con otros trabajos propios del grupo de investigación, el doctorando contribuyó a la caracterización de la proteína septin 11 (SEPT11), en tejido adiposo humano y su posible implicación en la regulación del metabolismo de los adipocitos, trabajo que fue publicado en la revista *Diabetología* (2017). Los resultados han sido también presentados en congresos de ámbito nacional e internacional, algunas de las cuales han recibido premios. Concretamente, el Doctorando ha presentado 5 comunicaciones tipo Póster y 2 comunicaciones orales en congresos de ámbito nacional, y 1 comunicación tipo póster en un congreso internacional.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 29 de Septiembre de 2020

Firma del/de los director/es

Fdo.: Prof. **Dra. María del Mar Malagón**

Fdo.: Prof. **Dra. Rocío Guzmán Ruiz**



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección de los Dres. María del Mar Malagón Poyato y Rocío Guzmán Ruiz. El proyecto sido subvencionado mediante una beca del Programa Nacional de becas FPI (Ref. BES-2014-069850) concedida por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Durante el transcurso de la presente Tesis Doctoral se ha realizado una estancia de tres meses en el Mass Spectrometry Research Center de Vanderbilt University School of Medicine en Nashville (TN, EEUU) bajo la supervisión del Dr. Richard M. Caprioli, financiada por las ayudas a la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centro de I+D españoles y extranjeros 2015 (Ref. EEBB-I-16-11645)



## AGRADECIMIENTOS





Nunca me hubiera imaginado que me costaría tantísimo rellenar este apartado de agradecimientos. Resulta increíble, pero hasta que no llega este momento no te das cuenta de la magnitud del camino que has recorrido y todo lo que eso conlleva. A lo largo de todo este tiempo, he vivido todo tipo de experiencias, buenas y malas, pero es precisamente en éstas últimas donde he podido apreciar la calidad humana de la gente que me rodeaba. Me siento sumamente afortunado de haber compartido todo este tiempo con gente que me ha aportado mucho tanto a nivel personal como profesional y probablemente las siguientes líneas no hagan justicia a todos los agradecimientos que me gustaría hacer por separado.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de tesis, María del Mar, Rafa y Rocío que depositaran su confianza en mí para llevar a cabo un proyecto tan ambicioso y me dieran la oportunidad de trabajar en grupo. Gracias a sus consejos y orientaciones, me enseñaron a ser mejor investigador día tras día y siempre les estaré agradecido por todo lo que hicieron por mí. Como no podía ser de otra manera, quisiera darles las gracias a todos mis compañeros de laboratorio, ya que han sido mis compañeros de batalla y sin ellos nada de esto hubiera sido lo mismo. Hemos vivido momentos de todo tipo, y todos ellos igual de especiales, pero siempre recordaré las reuniones hipercalóricas, los disfraces y las ferias de la ciencia, las anécdotas de los congresos o el recopilatorio de frases del Lab GC-11 que tantas risas y alegrías nos dio. Quiero que sepáis que todos y cada uno de vosotros habéis contribuido en parte alguna a que este trabajo saliera adelante y me siento muy orgulloso de haber trabajado con vosotros durante todo este tiempo. Ha sido un inmenso placer formar parte de la familia adipocitaria y siempre os llevaré en el corazón. De igual forma, quisiera tener un reconocimiento para todo el personal del IMIBIC en general y de manera más particular a las UCAI sin las cuales gran parte de este trabajo no hubiera sido posible. Mención especial para la unidad de Proteómica y Eduardo Chicano, con quien he tenido la suerte de trabajar codo con codo durante todos estos años. No menos importante han sido mis compañeros de despacho, mis queridos Minions. No sólo hemos sido compañeros de alegrías y penas, sino que además hemos forjado una bonita amistad que estoy seguro de que permanecerá a lo largo del tiempo por mucha distancia y tiempo que nos separe. Estoy orgulloso de todos y cada uno de vosotros, desde los originales hasta los más nuevos y os deseo la mejor de las suertes en vuestras respectivas vidas. También quisiera agradecer a todos mis compañeros del Departamento de Biología Celular porque, aunque hayamos pasado muy poco tiempo juntos por no trabajar en el mismo campus, me habéis acogido como uno más desde el primer momento y siempre me he sentido muy arropado por todos vosotros.

Finalmente, quisiera dedicar unas palabras de agradecimiento para mi familia y amigos. Ellos son los pilares de mi vida y conforman mi mayor riqueza, estando siempre en los buenos momentos, pero, sobre todo, en los malos. Me siento muy afortunado de tenerlos a mi lado y sin vuestro apoyo y cariño incondicional nada de esto hubiera sido posible.

Gracias Papá y Mamá, por ser los mejores modelos de vida. Os debo todo lo que soy y jamás podré corresponder todo lo que habéis hecho y seguís haciendo por mí cada día.

**Esta tesis es de todos y cada uno de vosotros**



*“El éxito consiste en ir de fracaso en fracaso sin perder el entusiasmo” - W. Churchill*



ACRÓNIMOS



<b>AADHAP-R</b>	Acyl/alkyl-dihydroxyacetone phosphate reductase
<b>AAG3P-AT</b>	Acyl/alkyl-G3P-acyltransferase
<b>AC</b>	Adenilil ciclase
<b>ACC</b>	Acetil-coa carboxilasa
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>ACSL1</b>	Coa Ligasa 1
<b>ADNc</b>	ADN cíclico
<b>AGPAT3</b>	1-acilglicerol-3-fosfato o-acyltransferasa 3
<b>AGPS</b>	Alquilglicerol fosfato sintasa
<b>APCI</b>	Ionización química a presión atmosférica
<b>ASP</b>	Proteína estimulante de la acilación
<b>AT2</b>	Angiotensina II
<b>ATGL</b>	Lipasa de triglicérido adiposo
<b>BAT</b>	Tejido adiposo marrón
<b>BF1-7</b>	Bradiquinina
<b>BMP</b>	Proteínas morfogenéticas del hueso
<b>BSA</b>	Suero bovino de albúmina
<b>C/EBP</b>	Proteínas de unión al potenciador de CCAAT
<b>cAMP</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>CCT</b>	Carbon conductive tape
<b>CEPT1</b>	Colina/etanolamina fosfotransferasa 1
<b>CERK</b>	Ceramida quinasa
<b>CerS</b>	Ceramida sintasa
<b>CerT</b>	Ceramida transferasa
<b>CETP</b>	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
<b>CHPT1</b>	Colina fosfotransferasa 1
<b>ChREBP</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
<b>CM</b>	Cloroformo/metanol
<b>D-PBS</b>	Dulbecco's phosphate-buffered saline
<b>DAN</b>	1,5-diaminonaftaleno
<b>DEGS</b>	Dihidroceramida desaturasa
<b>DGAT</b>	Diacilglicerol aciltransferasa
<b>DHA</b>	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
<b>DHB</b>	2,5-dihidroxiacetofenona
<b>DMEM</b>	Dulbeco's modified eagle medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNL</b>	Lipogénesis de novo
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>ESI</b>	Electropulverización
<b>FABP4</b>	Proteína de unión a ácidos grasos 4
<b>FAR1</b>	Acil-coa reductasa 1 de ácidos grasos
<b>FAS</b>	Sintasa de ácidos grasos
<b>FAT/CD36</b>	Proteína translocasa de ácidos grasos

<b>FATP</b>	Proteína transportadora de ácidos grasos
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FFA</b>	Ácidos grasos libres
<b>G3P</b>	Fosfato 3 glicerol
<b>GCS</b>	Glucoesfingolipido sintasa
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento
<b>GLUT4</b>	Proteína transportadora de glucosa 4
<b>GNPAT</b>	Glicerofosfato o-aciltransferasa
<b>GTT</b>	Prueba de tolerancia a la glucosa
<b>GWAS</b>	Estudios de asociación de genoma completo
<b>HbA1c</b>	Prueba de hemoglobina glicosilada
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>HFD</b>	Dieta alta en grasa
<b>HGHI</b>	Hiperglucemia/hiperinsulinemia
<b>HILIC</b>	Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia
<b>HSL</b>	Lipasa sensible a hormonas
<b>IBMX</b>	3-isobutyl-1-methylxanthine
<b>IGT</b>	Intolerancia a la glucosa
<b>IL-s</b>	Interleuquinas
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IQR</b>	Rango intercuartílico
<b>IR</b>	Insulinoresistentes
<b>ITO</b>	Indium tin oxide
<b>ITT</b>	Prueba de tolerancia a la insulina
<b>JNK</b>	Quinasa c-Jun N-terminal
<b>LC</b>	Cromatografía líquida
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>LFD</b>	Dieta baja en grasa
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipasa
<b>M1</b>	Macrófagos tipo 1 pro-inflamatorios
<b>M2</b>	Macrófagos tipo 2 anti-inflamatorios
<b>MAG</b>	Monoacilglicerol
<b>MALDI-IMS</b>	Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry
<b>MBT</b>	2-mercaptobenzotiazol
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos
<b>MGL</b>	Monoacilglicerol lipasa
<b>MHO</b>	Metabolically healthy obese
<b>MTBE</b>	Metil terc-butil éter
<b>MTT</b>	Bromuro 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>MUHO</b>	Metabolically unhealthy obese
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NCS</b>	Suero de neonato bovino

<b>NG</b>	Normoglucémico
<b>NL</b>	Camada normal
<b>NPLC</b>	Cromatografía líquida en fase normal
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PET</b>	Tomografía por emisión de positrones
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PLS-DA</b>	Análisis discriminante de la regresión de mínimos cuadrados parciales
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma
<b>QqQ</b>	Analizador de tipo triplecuadrapolo
<b>QTOF</b>	Analizador cuadrapolo
<b>RB-4</b>	Proteína ligadora de retinol-4
<b>RPLC</b>	Cromatografía líquida en fase reversa
<b>RXR<math>\alpha</math></b>	Receptor X retinoide alfa
<b>SL</b>	Camada pequeña
<b>SMPD2</b>	Esfingomielina fosfodiesterasa 2
<b>SMS</b>	Esfingomielina sintasa
<b>SPE</b>	Extracción en fase sólida
<b>SPT1</b>	Serina C-palmitoiltransferasa
<b>SREBP1</b>	Proteína 1 de unión a elementos reguladores de esteroides
<b>Stat5</b>	Transductor de señal y activador de transcripción 5
<b>T2D</b>	Diabéticos tipo 2
<b>TA</b>	Tejido adiposo
<b>TAI</b>	Tejido adiposo intraabdominal
<b>TASC</b>	Tejido adiposo subcutáneo
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral
<b>UCP1</b>	<i>Uncoupling protein-1</i>
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>VLDL-TG</b>	Lipoproteína de muy baja densidad que contiene triglicéridos
<b>WAT</b>	Tejido adiposo blanco
<b><math>\beta</math>-AR</b>	Receptor $\beta$ -adrenérgico





ÍNDICE



SUMMARY .....	1
RESUMEN .....	13
1. INTRODUCCIÓN .....	27
1.1.- Obesidad.....	27
1.2.- Tejido Adiposo.....	32
1.2.1 Tipos de Tejido Adiposo.....	32
1.2.2 Localizaciones del tejido adiposo.....	34
1.2.3 Componentes del tejido adiposo.....	36
1.2.4 Dinámica celular del tejido adiposo.....	38
1.2.5 Mecanismos de diferenciación adipocitaria.....	39
1.2.6 Metabolismo lipídico en el tejido adiposo .....	41
1.2.6.1.- Lipogénesis .....	42
1.2.6.2.- Lipólisis .....	43
1.3.- Alteraciones del tejido adiposo en obesidad.....	45
1.3.1.- Expansibilidad del tejido adiposo .....	45
1.3.2.- Inflamación y tejido adiposo .....	46
1.3.3.- Heterogeneidad metabólica de los individuos obesos .....	48
1.4.- El lipidoma y rutas metabólicas de biosíntesis de lípidos .....	50
1.4.1.- Metabolismo de Esfingolípidos .....	53
1.4.2.- Metabolismo de Éter-fosfolípidos .....	55
1.5.- Aplicaciones lipidómicas para el estudio de la obesidad .....	57
1.5.1.- Cromatografía líquida de alta resolución (LC-MS) .....	58
1.5.2.- MALDI-Imaging .....	61
2. OBJETIVOS.....	65
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	67
3.1.- Sujetos y modelos experimentales. Criterios de selección y toma de muestras.	
3.1.1.- Cohorte de obesos con diferente perfil glucémico .....	67
3.1.2.- Modelo experimental <i>in vivo</i> : obesidad inducida por dieta .....	69
3.1.3.- Modelo experimental <i>in vitro</i> : adipogénesis y modelos de hiperglucemia/ hiperinsulinemia e inflamación.....	70
3.1.3.1.- Cultivo y diferenciación de línea celular 3T3-L1.....	70
3.1.3.2.- Modelos <i>in vitro</i> de adipocitos 3T3-L1: hiperglucemia/hiperinsulinemia (HGHI) e inducción de ambiente proinflamatorio (TNF $\alpha$ ) .....	71
3.1.3.3.- Ensayos de viabilidad celular .....	71
3.2.- Aproximaciones ómicas para el estudio del tejido adiposo .....	72
3.2.1.- Análisis del perfil lipídico de secciones histológicas mediante espectrometría de masas MALDI-Imaging .....	72
3.2.2.- Identificación y cuantificación de lípidos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC/MS-MS) .....	75
3.2.3.- Tinción de hematoxilina-eosina .....	76
3.2.4.- Análisis Bioinformático .....	77

<b>3.3.- Western Blotting</b>	78
3.3.1.- Obtención de extractos proteicos	78
3.3.2.- Electroforesis desnaturante y electrotransferencia	78
3.3.3.- Inmunodetección de proteínas	79
<b>3.4.- Análisis de expresión génica</b>	80
3.4.1.- Extracción de ARNm	81
3.4.2.- Retrotranscripción del ARNm	81
3.4.3.- Diseño y validación de cebadores	82
3.4.4.- PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	82
<b>3.5.- Análisis estadístico</b>	83
<b>4. RESULTADOS</b>	84
<b>4.1.- Optimización de un protocolo de MALDI-Imaging para el análisis del perfil lipídico del tejido adiposo en modelos murinos</b>	85
4.1.1.- Estrategias de preparación de la muestra	85
4.1.2.- Comparación de matrices de ionización y métodos de deposición	88
4.1.3.- Estrategias alternativas para la mejora de la adherencia del tejido	91
4.1.4.- Métodos de deposición simple o mixta de la matriz	92
4.1.5.- Optimización de la solución de la matriz	93
<b>4.2.- Análisis del perfil lipídico del tejido adiposo en modelos de obesidad y resistencia a insulina.</b>	
4.2.1.- Generación y validación del modelo animal de obesidad	97
4.2.2.- Identificación del perfil lipídico mediante MALDI-IMS	100
4.2.3.- Análisis lipidómico dirigido por LC-QqQ MS/MS	103
4.2.4.- Análisis del perfil de distribución espacial de lípidos	108
<b>4.3.- Análisis lipidómico del tejido adiposo en pacientes con obesidad y resistencia a insulina...</b>	110
4.3.1.- Análisis lipidómico dirigido por LC-QqQ MS/MS en tejido adiposo humano.....	114
4.3.2.- Análisis del perfil de distribución espacial de lípidos mediante MALDI-IMS en tejido adiposo humano	119
<b>4.4.- Análisis de expresión de las enzimas implicadas en las rutas de biosíntesis de esfingolípidos y éter-fosfolípidos en adipocitos 3T3-L1.</b>	
4.4.1.- Evaluación del perfil de expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de esfingolípidos y éter-fosfolípidos durante el proceso de diferenciación celular	121
4.4.2.- Regulación de la biosíntesis de esfingolípidos y éter-fosfolípidos en modelos de obesidad y resistencia a insulina	127
4.4.3.- Análisis de la viabilidad celular tras exposición a los tratamientos HGHI y TNF $\alpha$	127
4.4.4.- Efectos de la exposición a los tratamientos HGHI y TNF $\alpha$ sobre la biosíntesis de esfingolípidos	128
4.4.5.- Efectos de la exposición a los tratamientos HGHI y TNF $\alpha$ sobre la biosíntesis de éter-fosfolípidos	130
<b>5. DISCUSIÓN</b>	135
<b>6. CONCLUSIONES</b>	159
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	163





## ÍNDICE DE FIGURAS





## INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b> Evaluación del grado de obesidad conforme al índice de masa corporal .....	27
<b>Figura 2.</b> Incrementos en la prevalencia de obesidad a lo largo del tiempo .....	29
<b>Figura 3.</b> Factores que influyen en el balance energético y contribuyen al desarrollo de obesidad ...	30
<b>Figura 4.</b> Procesos fisiológicos y metabólicos regulados por el WAT mediante la secreción de adipocinas .....	34
<b>Figura 5.</b> Distribución del WAT y BAT en humanos .....	35
<b>Figura 6.</b> Composición del tejido adiposo blanco .....	37
<b>Figura 7.</b> Mecanismos de expansión del tejido adiposo .....	39
<b>Figura 8.</b> Esquema sobre la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros .....	40
<b>Figura 9.</b> Mecanismos de regulación del metabolismo lipídico en adipocitos .....	41
<b>Figura 10.</b> Expansión del tejido adiposo blanco (WAT) en obesidad .....	46
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de las categorías de lípidos y la interrelación de sus rutas metabólicas .....	50
<b>Figura 12.</b> Esquema representativo de la síntesis de esfingolípidos .....	54
<b>Figura 13.</b> Metabolismo de éter-fosfolípidos .....	56
<b>Figura 14.</b> Dogma central de la biología molecular .....	58
<b>Figura 15.</b> Esquema global sobre las etapas principales y los componentes de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) .....	60
<b>Figura 16.</b> Esquema representativo de las etapas necesarias para llevar a cabo la técnica de MALDI-IMS en muestras biológicas .....	62

## MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Figura 17.</b> Representación esquemática de los métodos de deposición de la matriz empleados en los experimentos de MALDI-IMS usando muestras de tejido adiposo .....	73
<b>Tabla 1.-</b> Características antropométricas y bioquímicas de los sujetos incluidos en el estudio .....	68
<b>Tabla 2.-</b> Condiciones empleadas para la deposición de la matriz de ionización en muestras de tejido adiposo .....	74
<b>Tabla 3.-</b> Listado de anticuerpos primarios utilizados .....	80
<b>Tabla 4.-</b> Listado de genes seleccionados para su estudio por qPCR .....	80

## RESULTADOS

<b>Figura 18.</b> Esquema de las principales etapas de la preparación de muestras y posteriores puntos de control para la obtención de datos e imágenes por MALDI-IMS .....	86
<b>Figura 19.</b> Procesamiento de muestras por congelación en seco .....	87
<b>Figura 20.</b> Evaluación del método de seccionamiento en tejidos embebidos .....	88
<b>Figura 21.</b> Deslocalización de lípidos tras deposición de la matriz por sublimación .....	89
<b>Figura 22.</b> Deslocalización de lípidos tras deposición de la matriz usando la estación robótica SunCollect .....	90
<b>Figura 23.</b> Optimización y comparativa de diferentes matrices y métodos de deposición .....	91
<b>Figura 24.</b> Comparación múltiple de métodos de deposición simple y/o combinada de la matriz .....	93
<b>Figura 25.</b> Análisis comparativo de los espectros generados utilizando diferentes proporciones de solvente orgánico en la solución de la matriz .....	94
<b>Figura 26.</b> Efecto de la sobrenutrición neonatal y el consumo de dieta alta en grasa sobre la glucemia y los parámetros bioquímicos .....	98
<b>Figura 27.</b> Expansión del tejido adiposo en respuesta a la sobrenutrición postnatal y la alimentación rica en grasas .....	99
<b>Figura 28.</b> Análisis estadístico sobre el número de iones detectados de manera diferencial en el modelo animal de obesidad inducida por dieta y tamaño de camada .....	100
<b>Figura 29.</b> Análisis multivariante del perfil lipídico en modelos de obesidad .....	101
<b>Figura 30.</b> Análisis heatmap del perfil lipídico en modelos de obesidad .....	102
<b>Figura 31.</b> Distribución de las familias lipídicas identificadas por análisis lipidómico dirigido (LC-MS/MS) en modelos animales de obesidad inducida por dieta .....	103

<b>Figura 32.</b> Análisis cuantitativo del perfil lipídico en modelos animales de obesidad inducida por dieta.....	105
<b>Figura 33.</b> Patrones de distribución lipídica en secciones de tejido adiposo analizadas por MALDI-IMS .....	109
<b>Figura 34.</b> Criterios diagnósticos de diabetes y resistencia a insulina .....	110
<b>Figura 35.</b> Análisis estadístico sobre el número de iones detectados mediante MALDI-IMS de manera diferencial en el tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos con diferentes perfiles glucídicos .....	111
<b>Figura 36.</b> Análisis multivariante del perfil lipídico del tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos con diferentes perfiles glucídicos .....	112
<b>Figura 37.</b> Análisis del perfil lipídico del tejido adiposo subcutáneo en obesidad y normoglucemia, resistencia a insulina o diabetes tipo 2 .....	113
<b>Figura 38.</b> Análisis comparativo del perfil lipídico del tejido adiposo subcutáneo en obesidad y normoglucemia, resistencia a insulina o diabetes tipo 2 .....	116
<b>Figura 39.</b> Análisis del perfil de distribución espacial de lípidos en tejido adiposo humano de obesos con diferente grado de sensibilidad a insulina .....	120
<b>Figura 40.</b> Cuantificación de la expresión de las enzimas implicadas la síntesis de esfingomielinas y ceramidas mediante qPCR durante la diferenciación de adipocitos 3T3-L1 .....	122
<b>Figura 41.</b> Cuantificación de la expresión proteica de las enzimas implicadas la síntesis de esfingomielinas y ceramidas mediante <i>immunoblotting</i> durante la diferenciación de adipocitos 3T3-L1 .....	123
<b>Figura 42.</b> Cuantificación de la expresión de las enzimas implicadas la síntesis de éter-fosfolípidos mediante qPCR durante la diferenciación de adipocitos 3T3-L1 .....	125
<b>Figura 43.</b> Cuantificación de la expresión proteica de enzimas implicadas la síntesis de éter-fosfolípidos mediante <i>immunoblotting</i> durante la diferenciación de adipocitos 3T3-L1 .....	125
<b>Figura 44.</b> Cuantificación de la expresión proteica de enzimas relacionadas con el metabolismo energético y estrés del retículo endoplasmático u oxidativo durante la diferenciación de adipocitos 3T3-L1 .....	126
<b>Figura 45.</b> Ensayo de viabilidad celular mediante ensayo MTT en adipocitos 3T3-L1 tras su exposición a los tratamientos con HGHI y TNF $\alpha$ .....	128
<b>Figura 46.</b> Cuantificación de la expresión de las enzimas implicadas la síntesis de esfingomielinas y ceramidas mediante qPCR en modelos in vitro de adipocitos 3T3-L1 .....	128
<b>Figura 47.</b> Cuantificación de la expresión de las enzimas implicadas la síntesis de esfingomielinas y ceramidas mediante Western Blotting en modelos in vitro de adipocitos 3T3-L1 .....	130
<b>Figura 48.</b> Cuantificación de la expresión de las enzimas implicadas la síntesis de éter-fosfolípidos mediante qPCR en modelos in vitro de adipocitos 3T3-L1 .....	131
<b>Figura 49.</b> Cuantificación de la expresión de las enzimas implicadas la síntesis de éter-fosfolípidos mediante Western Blotting en modelos in vitro de adipocitos 3T3-L1 .....	131
<b>Figura 50.</b> Cuantificación de la expresión proteica de enzimas relacionadas con el metabolismo energético y estrés del retículo endoplasmático u oxidativo en modelos in vitro de adipocitos 3T3-L1 .....	132
<b>Tabla 5.</b> Listado de iones detectados mediante la técnica MALDI-IMS y posteriormente identificados como lípidos mediante LC-QqQ MS/MS en secciones de tejido adiposo de ratas delgadas frente a ratas obesas .....	107
<b>Tabla 6.</b> Características antropométricas y bioquímicas de los sujetos incluidos en el estudio .....	110
<b>Tabla 7.</b> Listado de iones detectados mediante la técnica MALDI-IMS y posteriormente identificados como lípidos mediante LC-QqQ MS/MS en secciones de tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos .....	117

## DISCUSIÓN

<b>Figura 51.</b> Esquema representativo de la biosíntesis secuencial de plasmalógenos en el peroxisoma y retículo endoplasmático .....	153
<b>Figura 52.</b> Esquema representativo de la biosíntesis de esfingolípidos .....	155





SUMMARY



## INTRODUCTION

Obesity is a multifactorial disease in which both genetic and socio-environmental factors are involved, including changes in dietary patterns and physical activity. The increase in consumption of high-calorie and ultra-processed foods, as well as the establishment of a more sedentary lifestyle, are fundamental causes in the evolution of this health and economic problem at a global level (Nyberg *et al.*, 2018). Currently, it is estimated that 39% of the population is overweight or obese (Chooi *et al.*, 2019) and if this trend continues, the global prevalence of obesity is projected to reach 18% in men and over 21% in women by 2025, while severe obesity will be over 6 % and 9 % in men and women, respectively (NCD Risk Factor Collaboration, 2016). This pathology represents an important risk factor for the development of cardiovascular diseases, type 2 diabetes, dyslipidaemia or cancer (Amoretti *et al.*, 2002; Czernichow *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013). It is also associated with a decline in quality of life and, depending on the degree of severity and its comorbidities, with a reduction in life expectancy from 5 to 20 years (Fontaine *et al.*, 2003). During obesity, there is a dysregulation of the balance between calorie intake and energy expenditure, resulting in a massive accumulation of lipids in the adipose tissue (Oussaada *et al.*, 2019).

The adipose tissue has traditionally been considered as a storage tissue for the body's energy reserves, as well as a mechanism for isolation and mechanical protection for certain vital organs. Nevertheless, it is nowadays clearly recognised as an endocrine organ producing numerous factors not only of a lipid nature but also of a protein nature, the adipokines, which participate in the regulation of numerous physiological and metabolic processes. There are two types of adipose tissue in the body: white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT), which differ both in their function and in the type of signalling molecules they release (adipoquins in WAT vs. Batoquins in BAT) (Amaia Rodríguez *et al.*, 2015; Villarroya *et al.*, 2017). In this work, we have focused our studies on WAT, which stores in the form of triglycerides (TGs) the excess of energy produced during the intake, these triglycerides are accumulated intracellularly in the adipocyte, or released into the bloodstream as fatty acids and glycerol during periods of fasting and/or increase in the energy demand (Rosen & Spiegelman, 2006; Scherer,

2019; Stephens, 2012). With respect to the adipokines secreted by WAT, it includes very diverse proteins that perform a heterogeneous range of functions, including, among others, regulation of the immune system (Interleukins, TNF $\alpha$  and MCP-1), appetite and intake (leptin), lipid metabolism (RB-4 and CETP), carbohydrate homeostasis (adiponectin, resistin, visfatin), angiogenesis (VEGF), regulation of blood pressure (angiotensinogen), vascular haemostasis (PAI-1), growth factors (TGF $\beta$ ) and acute phase proteins and stress response (haptoglobin and 1 $\alpha$ -acid glycoprotein) (Dutheil *et al.*, 2018; Molica *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2015). On the other hand, WAT is distributed in two main locations: visceral (VAT) and subcutaneous (SAT). While VAT is commonly related to the development of metabolic disorders such as type 2 diabetes and cardiovascular diseases (Shuster *et al.*, 2012), it has been proposed that SAT may play a protective role on lipid metabolism in conditions of obesity by serving as a storage for the excess of lipids that occur in such conditions (Tran & Kahn, 2010). Similarly, it has been described that the distribution of WAT may vary with respect to age, sex or genetic factors. While there is a direct proportional relationship between age and intra-abdominal fat mass, it has also been described that men tend to accumulate fat in higher regions (android morphology) while women do so in the lower body (gynoid morphology) (Okosun *et al.*, 2015).

Adipocytes, cells specialised in the accumulation of lipids, are the main component of adipose tissue. The differentiation of the precursor cells from the adipocytes present in the adipose tissue, the pre-adipocytes, is a complex process in which both the PPAR $\gamma$  nuclear receptor and various members of the C/EBP transcription factor family are involved (Ghaben & Scherer, 2019; Vanessa Pellegrinelli *et al.*, 2016; Pyrina *et al.*, 2020). Pre-adipocytes and mesenchymal stem cells present in adipose tissue together with endothelial cells and a variety of immune cells, including macrophages, lymphocytes and neutrophils, form the so-called vascular stromal fraction (Elgazar-Carmon *et al.*, 2008; Kintscher *et al.*, 2008; Tchoukalova *et al.*, 2004). The proportion of each of these cell types can vary, not only in relation to age, but also according to the degree of inflammation and location of the adipose tissue (Rosen & Spiegelman, 2014; Russo & Lumeng, 2018). In fact, it is widely accepted that obesity is associated with a state of chronic low-grade inflammation (Kane & Lynch, 2019; Lu *et al.*, 2019; Schipper *et al.*,



2012). The maintenance of a chronic inflammatory state in obesity causes an imbalance in the proportion of cells in the immune system, favouring both a greater degree of infiltration of adipose tissue by macrophages and changes in their phenotype to a pro-inflammatory profile (Christiansen *et al.*, 2005; Orecchioni *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2014). The cells of the immune system are critical to the proper functioning of adipose tissue in healthy individuals, so inflammation of adipose tissue is considered a major factor triggering the metabolic dysfunction associated with obesity (Crewe *et al.*, 2017; DiSpirito & Mathis, 2015).

On the other hand, the capacity of adipocytes to increase their size (hypertrophy) or their number and proportion (hyperplasia) constitutes an essential adaptive mechanism of the tissue to be able to confront an excessive caloric intake chronically. Under normal conditions, the volume of adipocytes is regulated by a balance between the processes of accumulation (lipogenesis) and hydrolysis of lipids (lipolysis). For its part, the number of adipocytes is determined by a balance between the mechanisms of proliferation and those of cell regeneration by apoptosis. However, under conditions of obesity, altered expansion of adipose tissue occurs, leading to the appearance of several pathogenic processes including the presence of hypertrophic and dysfunctional adipocytes and the development of fibrosis and hypoxia, in addition to the state of inflammation mentioned above (Arner *et al.*, 2010; Crewe *et al.*, 2017; Datta *et al.*, 2018; Kahn *et al.*, 2019; Weyer *et al.*, 2000). These processes lead to a limitation in the storage capacity of adipose tissue, causing it to be redirected to other tissues such as skeletal muscle or liver and trigger the development of insulin resistance and metabolic disease (Carobbio *et al.*, 2017; Danforth, 2000; Slawik & Vidal-Puig, 2007; Virtue & Vidal-Puig, 2010). In summary, obesity can be defined as a complex and multifactorial pathology in which adipose tissue dysfunction occurs due to the intervention of numerous pathogenic mechanisms (cellular hypertrophy, inflammation, fibrosis or hypoxia) whose molecular bases are not yet fully known. Therefore, the identification of markers associated with the development of metabolic diseases in obesity is essential to analyse the knowledge of this pathology in depth and to be able to develop strategies aimed at the diagnosis and treatment of its comorbidities.

In this context, omics technologies have contributed to a greater understanding of the extent and complexity of the dysregulation present in obesity and metabolic syndrome (Han, 2016). In particular, recent advances in analytical techniques for separating biomolecules, and their combination with mass spectrometry, have made it possible to detect a wide range of lipid species quickly, sensitively and reliably, using a minimum sample quantity (Blanksby & Mitchell, 2010; Han *et al.*, 2012). In general, the identification and quantification of lipids in biological samples is a topic of interest in the field of biomedical research (Rustam & Reid, 2018) and, more specifically, in the field of obesity and associated pathologies (Hammarstedt *et al.*, 2018). Although initial studies were limited in size and coverage of the identified lipidome, more recent population-based studies using serum or plasma samples have revealed potential roles for a wide variety of lipid species in the development and evolution of metabolic disease (Meikle & Summers, 2017). Likewise, the physiological mechanisms that lead to an alteration of lipid homeostasis in obesity are complex as they involve a large number of lipid species and their metabolic pathways of biosynthesis are interconnected (Meikle & Summers, 2017). However, a role for many sphingolipids (SPs) and ether phospholipids (EPLs) has been proposed as critical components in the development of obesity and insulin resistance or type 2 diabetes based on observed changes in their basal plasma levels and, according to a few studies, in metabolic organs such as liver and adipose tissue, under such conditions (Meikle & Summers, 2017). The knowledge of the mechanisms that regulate the biosynthesis of these lipid forms could be used to develop new therapeutic targets in obesity and metabolic disease. Therefore, the main objective of the present doctoral thesis has been to identify the quantitative and qualitative changes that affect the lipidome of adipose tissue in conditions of obesity and insulin resistance, as well as the possible alterations that occur in the biosynthesis pathways of the lipids modified in such conditions.

## MATERIALS AND METHODS

To achieve this general objective, we have used multiple strategies to analyse adipose tissue lipidome in murine and human models of obesity, both at a qualitative and quantitative level and at the level of space distribution of the lipids present in these tissues. We have also analysed the pathways involved in the biosynthesis of SPs and EPLs in response to pathogenic processes associated with the development of insulin resistance in obesity using *in vitro* adipocyte models.

To investigate the changes that occur in the profile and space distribution of the lipidome of adipose tissue, frozen samples of murine and human subcutaneous adipose tissue (SAT) were used, to which the matrix-assisted laser desorption ionization- Imaging Mass Spectrometry (MALDI-IMS) technique was applied. In the optimization of each of the stages of the MALDI-IMS technique, samples of a diet and litter size induced murine model of morbid obesity previously developed by IMIBIC researchers were used (Novelle *et al.*, 2017; Sánchez-Garrido *et al.*, 2015). The serial sections were obtained using a cryostat and mounted by defrosting on standard slides for haematoxylin/eosin staining or on ITO conductive slides alone or in combination with carbon tape, for its analysis by MALDI-IMS. The ionisation matrix deposition experiments were performed using three different protocols (sublimation, robotic sprayer station and dry deposition) and four matrices with different properties and methods of ionisation (DHA, DHB, DAN and MBT). The spectra were obtained in positive polarity, using a 5800 MALDI-TOF/TOF mass spectrometer in the  $m/z$  range from 350 to 1100, with a lateral resolution of 150  $\mu\text{m}$  between pixels. The commercial reagents Bradikynin (BF1-7) and Angiotensin (AT2) were used for the internal calibration of the spectra.

As a complement to the MALDI-IMS studies, a liquid chromatography system was used, coupled either to a hybrid mass spectrometer (QTOF) or to a tri-quadrupole type analyser (QqQ), which were applied to lipid extracts obtained from adipose tissue samples. To this end, a process of optimizing the extraction of lipids from these samples was carried out beforehand, using two types of extractants in different ratios (MTBE and CM) and a solid sample extraction protocol (SPE).

Samples of morbidly obese normoglycaemic, insulin-resistant and type 2 diabetic individuals, classified according to American Diabetes Association criteria (ADA, 2019), were used to characterise the lipid footprint associated with the development of obesity and insulin resistance in human adipose tissue. In relation to the pathways involved in the biosynthesis of SPs and EPLs, we have used the 3T3-L1 adipocyte cell line, which were analysed during the differentiation process induced by exposure to the hormone cocktail. We also use two *in vitro* models that mimic two pathogenic processes associated with obesity: hyperglycaemia/hyperinsulinemia, through exposure of 3T3-L1 adipocytes to high concentrations of glucose (4.5 g/l) and insulin (100 nM) (24 h), or of inflammation, through exposure to TNF $\alpha$  (5 nM, 24 h). The analysis of protein expression was done by immunoblotting the enzymes involved in both the adipogenesis process (Days 0-3-6-9) and after exposure to both treatments (HGHI y TNF $\alpha$ ). Finally, the evaluation of the gene expression levels of the selected genes was done by a real time PCR, using the LightCycler® 96 system.

## RESULTS AND DISCUSSION

In recent decades, there has been increasing interest in investigating the mechanisms underlying the development of obesity, as well as in the search for useful biomarkers that can predict the pathological alterations that occur in adipose and other related tissues (Aleksandrova *et al.*, 2020; López-Villar *et al.*, 2015; Peinado *et al.*, 2014). In this context, omics techniques have predominated in the field of clinical research, with both genomic and transcriptomics studies and proteomic studies in animal and human models of obesity (Novelle *et al.*, 2017; Aleksandrova *et al.*, 2020). However, while several related proteomic studies have been conducted, including the characterization of adipose tissue components (Peinado *et al.*, 2011; Diaz-Ruiz *et al.*, 2015; Guzman-Ruiz *et al.*, 2020), or the response to weight loss after bariatric surgery (Moreno-Castellanos *et al.*, 2016), lipidomic studies of adipose tissue are more limited, despite the fact that lipids are essential components of the body (Fuchs, 2014). Thanks to recent advances in the field of lipidomics, it has been possible to elucidate some of the mechanisms involved in the lipid dysregulation that occurs in obesity and the development of metabolic disease (Han, 2016). Precisely, lipidomics based on mass spectrometry is

emerging as a powerful analytical tool to investigate changes in the lipid composition of adipose tissue in animal and human models. In particular, some studies related to obesity have been published, mainly on serum samples and, to a lesser extent, on tissue samples (Henstridge & Bozaoglu, 2017). Nevertheless, only one lipidomic study has been published to date (in fact, it has been published very recently), which analyses the space distribution of lipids in this type of tissue, which is highly enriched in lipids (Fournelle *et al.*, 2020). Therefore, during the development of this doctoral thesis, multiple strategies have been developed and applied to conduct an analysis of the composition and spatial distribution of the lipidome of the adipose tissue. In this way, it is intended to contribute to the study of obesity and insulin resistance, providing new analytical tools to elucidate the physiopathological mechanisms that are deregulated as a result of the development of metabolic disease.

The versatility of the MALDI-IMS technique for mapping changes in the distribution of numerous analytes has been demonstrated in many pathologies (Korte *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2012; Stoeckli *et al.*, 2001). However, its application in tissues highly enriched in lipids, such as adipose tissue, lacking a compact structure and with a soft morphology, made its application difficult, presumably due to the lack of adapted and efficient protocols. In this type of sample, a great challenge is presented since the lipids are mobilised when they come into contact with the ionisation matrix, thus preventing the analysis of their original positions within the tissue. Consequently, this work describes all the strategies carried out to adapt each of the critical stages of sample preparation to the intrinsic properties of the adipose tissue, including methods of tissue sectioning and deposition of the ionisation matrix. To obtain serial sections, both dry cutting strategies and samples embedded in polymer solutions to reinforce their structure were tested. Four matrices (DAN, MBT, DHA and DHB), widely used in lipid analysis, were used for matrix deposition (Leopold *et al.*, 2018; Thomas *et al.*, 2012; Perry *et al.*, 2020) but, when applied to the sample by means of different deposition strategies (sublimator, robotic sprayer station and dry deposition), lipid diffusion occurred in all cases. Besides, the use of alternative surfaces for sample deposition, previously described in other studies (König, 2008; Nimesh *et al.*, 2013; Norris & Caprioli, 2013; Zavalin *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012) proved to be ineffective in containing the sample lipids. Finally, the

use of a conductive carbon tape, previously described in MALDI-IMS studies of proteins with complete sections of other tissues (Anderson *et al.*, 2015; Khatib-Shahidi *et al.*, 2006) proved to be decisive both for preserving the anatomical structure of the tissue and for minimising the diffusion of the analytes present in the sample.

Since the application method has been described as having a direct influence on the quality of the spectra, both the matrix solution and the form of deposition on the sample (single or combined) were optimised. It is widely accepted that factors such as sample manipulation, ion suppression or normalisation can influence the quantification of images obtained by mass spectrometry (Irie *et al.*, 2014; Shobo *et al.*, 2016; Stepanka *et al.*, 2019). Due to this fact, our analyses were supported by LC-MS/MS to give a higher degree of robustness to the lipid annotations. As a previous step, an optimization of the lipid extraction protocol was carried out, in which different extractants (MTBE and CM) and two types of analysers (QTOF and QqQ) were tested. The results obtained allowed us to establish rat SAT lipidome, in which we detected a predominance (57% of total lipidome) of phosphatidylcholine forms (PCs, Lyso-Ps, PC-Os and PC-Ps) as well as a high proportion of SPs (9% of total lipidome). In conclusion, in this work we have established for the first time a specific methodology for the analysis of adipose tissue sections using MALDI-IMS which includes complementary validation and annotation strategies using LC-MS/MS. To do this, in our protocol the sections were deposited on a conductive carbon tape and subsequently coated with the DHB matrix as a preliminary step to their analysis. Once our protocol was validated, we analysed the lipid profile of diet-induced animal obesity models (high-fat diet, HFD) and litter size. These studies revealed important differences in the composition of lipidome associated with adipose tissue during the development of obesity. Specifically, the results showed that the combination of both obesogenic effects, small litter and HFD, produced a remodelling of the lipid profile in SAT, as well as an increase in the total lipid concentration, while suggesting that each family of lipids is independently regulated by mechanisms that could be associated with the function they perform within the tissue. Notably, we observed significant changes in the proportion of PLs constituted by choline (LPC-Ps and PC-Ps) as well as a numerical, although not significant, decrease in the total concentration of structural lipids of the plasma membrane (PEs and SMs) and markers

(PLs), although differences were found in representative species of these families. In this context, thanks to the images obtained by MALDI-IMS, we could monitor the changes in the zonation of the lipid species SM(d18:0\_18:2), PC(O-16:0\_16:1) and PE(P-16:0\_20:0). Thus, the species SM(d18:0\_18:2), increased in obese animals, was enriched in areas occupied mostly by adipocytes, while PC(O-16:0\_16:1) and PE(P-16:0\_20:0), with reduced levels in obese animals, correlated with the vascular stromal fraction. As a whole, these results reinforce the hypothesis that, during obesity, there is a dysregulation of the composition of cell membranes, modifying the proportion of essential and structural lipids such as plasmalogens (PLs) and sphingomyelins (SPHs), which can have repercussions on essential functions of adipocyte physiology such as cell signalling or lipid trafficking and metabolism.

Similar to what was observed in the animal model, analysis of the SAT lipid profile of obese individuals with different degrees of sensitivity to insulin revealed a modification of the lipidome associated with the different study groups. On the one hand, it was observed that during the development of IR/T2D there is an increase in the total lipid content, being remarkable the increase of glycerophospholipids in general and EPLs in particular. Likewise, a decrease in the content of SPHs in the IR and T2D groups was detected with respect to the NG group. Given the functions exercised by these lipids (Santos & Preta, 2018), these results suggest that the remodelling of cell membranes, especially in hypertrophic adipocytes, could constitute an adaptive mechanism of the adipose tissue to facilitate its expansion during the development of obesity and metabolic disease. The changes produced in the conformation of the plasma membrane would serve to counteract the mechanical stress to which the cells are subjected as a consequence of the development of fibrosis in the tissue, especially in obese individuals of the IR and T2D group (Guzmán-Ruiz et al., 2020). On the other hand, CER levels experienced a decrease in the IR group, although they increased in the T2D group, suggesting that dysregulation of these lipid forms could be an aggravating factor in the development of metabolic disease (Kayser et al., 2019; Sokolowska & Blachnio-Zabielska, 2019). In turn, the levels of SPs increased significantly in obese people with metabolic disease, which could be interpreted as a response mechanism to the oxidative stress that occurs in IR and T2D conditions. Our results support the hypothesis that, as

with oxidative stress, the lipid profile of adipose tissue in obese NG probably reflects an adaptive cellular defence response to the insults of obesity while the changes observed in the transition from the NG to IR phenotype correspond either to the accumulation of lipids with cytotoxic effects or to the loss of lipids with protective functions in the tissue. In this line, the results obtained by MALDI-IMS allowed to discriminate differences in the lipid footprint related to each of the groups studied, detecting a greater number of significant species between NG vs. T2D and IR vs. NG. Specifically, in the obese IR and T2D, changes were detected in practically all the families of lipids with respect to the NG group. In addition, a significant increase in the levels of LPCs, LPEs and PAs was observed in the IR group with respect to the NG group. It should be noted that dysregulation of sphingolipids has been correlated with inflammatory processes in obesity (from Bas *et al.*, 2016) while PA is involved in insulin signalling processes through mTOR receptors (Fang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2012). Finally, the IR vs. T2D comparison showed significant differences in the concentration of EPLs, glycerophospholipids and ceramides, which could indicate that these lipids are involved in the worsening of the metabolic disease associated with obesity. Overall, these results are in line with what has been observed in our studies on murine models of obesity (thin vs. obese IR by HFD and litter), where these families of lipids appear as markers of adipose tissue dysfunction during the development of metabolic disease.

As a complement to the results obtained at the quantitative level, a human SAT zonation analysis was conducted on some of the significant species detected among the three study groups. The results showed that SM(d18:1\_22:0) sphingomyelin, whose levels were higher in the IR and T2D groups, accumulated preferentially in regions occupied by adipocytes. These results are consistent with previous studies, in which an excess of SPHs was associated with the development of insulin resistance (Li *et al.*, 2011) and metabolic disease (Russo *et al.*, 2013; Sui *et al.*, 2019). In contrast, the distribution of EPLs was more heterogeneous in adipose tissue, except for the PC(P-16:0\_20:5) species, whose distribution was associated with the stroma fraction in the NG group and whose levels were lower in the NG vs. IR comparison, but higher in T2D. Since it has been described that SPs can participate in a multitude of biological processes (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018), this differential distribution with respect to other



lipid species of the same family could suggest a more specific function within the adipose tissue.

Taken together, these results indicate that the pathophysiological conditions underlying the development of obesity and insulin resistance or type 2 diabetes promote a substantial modification of the lipidome associated with adipose tissue, specifically affecting both the concentration of lipid species and their spatial distribution in the tissue. Likewise, our results show that, despite the complexity and heterogeneity present in studies using biological samples of human origin, the use of our optimized MALDI-IMS protocol in adipose tissue samples is very useful to predict the physiopathological state of each group of patients based on their lipid profile. Although many of the pathways related to the metabolism of specific lipid species are not yet fully known, there has been progress in the understanding of the general enzymes involved in the biosynthesis of many families of lipids. As a complement to lipidomic studies, a characterisation of the enzymes involved in the biosynthesis of SPs and EPLs was carried out, as they showed differential expression in obesity and IR. In relation to the biosynthesis of ether-lipids, our studies showed a differential temporal pattern during the process of adipogenesis, associated with two organelles involved in this biosynthetic process: peroxisomes and endoplasmic reticulum (Braverman & Moser, 2012). In this sense, we observe that the enzymes that catalyse the first steps of ether-lipid biosynthesis in peroxisomes (FAR1, GNPAT, AGPS), showed higher levels in early stages of adipogenesis (i.e., at the beginning of lipid accumulation in lipid droplets). On the other hand, the enzymes located in the ER (AGPAT3, CEPT1 and CHPT1), increased their levels of expression in later stages. Likewise, the results obtained in *in vitro* insulin resistance models suggest that the conditions of hyperglycaemia/hyperinsulinemia and inflammation suffered by adipose tissue in obesity could contribute, through their effect on adipocyte cell organelles, to dysregulation in the production of EPLs, with important potential consequences on the fluidity of the adipocyte plasma membrane and its response capacity to oxidative stress (Wallner and Schmitz, 2011; Brites *et al.*, 2004). In addition, since ER stress and inflammatory markers have been described as elevated in patients suffering from obesity (Pagliassotti *et al.*, 2016), we decided to analyse the protein expression of some ER and oxidative stress markers (BiP, GSS, CHOP, Catalase).

On the one hand, results showed that all enzymes, except CHOP, which reaches its activation peak on day 6 of differentiation, showed elevated expression levels from day 3 of differentiation, with levels maintained at later stages. On the other hand, HGHI conditions affected ER stress to a greater extent, decreasing the protein content of BiP and increasing GSS levels, while TNF $\alpha$  treatment significantly altered catalase and adiponectin levels, reducing antioxidant defences and causing adipocyte dysfunction. With respect to the biosynthesis of SPs, our expression results showed a differential effect on the compartments to which the enzymes involved are associated. While SPs are produced in the Golgi apparatus or in the plasma membrane, ceramides can be produced at an intracellular level in the ER, be recycled by means of endolysosomes or be synthesised in the plasma membrane (Hannun & Obeid, 2018). In our studies, we observed that most enzymes experienced a significant change in their levels of expression from day 3 of cell differentiation, when cells begin to accumulate lipid droplets. Similarly, the expression of these enzymes reached either their maximum or minimum peak of expression once the adipocyte has completed its maturation and, consequently, there is a greater intracellular accumulation of lipids. On the other hand, the results of measuring the expression of enzymes related to sphingolipid biosynthesis in *in vitro* models of insulin resistance suggested that while treatment with HGHI could favour the biosynthesis of SPs at an intracellular level and CERs in the plasma membrane, exposure to TNF $\alpha$  would cause a generalised decrease in the expression of all the enzymes involved. In conclusion, these results suggest a differential regulation of each lipid biosynthesis pathway in response to the different pathogenic processes that are activated in obesity and that, together, contribute to the development of insulin resistance.





RESUMEN



## INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad compleja y multifactorial en la que intervienen tanto factores genéticos como biológicos y socio-ambientales, incluyendo cambios en la pauta de alimentación y actividad física. El aumento del consumo de alimentos hipercalóricos y ultraprocesados, así como la implantación de un estilo de vida más sedentario, son causas fundamentales en la evolución de este problema de salud y económico a nivel mundial (Nyberg *et al.*, 2018). Actualmente se estima que un 39% de la población tiene sobrepeso u obesidad (Chooi *et al.*, 2019) y de seguir esta tendencia, se prevé que, para 2025, la prevalencia mundial de obesidad alcanzará el 18% en hombres y estará por encima del 21% en mujeres, mientras que la obesidad severa será superior al 6% y 9% en hombres y mujeres, respectivamente (NCD Risk Factor Collaboration, 2016). Esta patología representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, dislipemia o cáncer (Amoretti *et al.*, 2002; Czernichow *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013). También está asociada con una disminución de la calidad de vida y según el grado de severidad y sus comorbilidades, con una reducción en la esperanza de vida de 5 a 20 años (Fontaine *et al.*, 2003). Durante la obesidad, se produce una desregulación del balance entre la ingesta de calorías y el gasto energético, lo que se traduce en una acumulación masiva de lípidos en el tejido adiposo (Oussaada *et al.*, 2019).

El tejido adiposo se ha considerado tradicionalmente como un almacén pasivo de las reservas energéticas del organismo, así como una estructura de aislamiento y protección mecánica para órganos vitales. Sin embargo, en la actualidad está claramente reconocido como un órgano endocrino productor de numerosos factores no sólo de carácter lipídico sino también proteico, las adipoquinas, que participan en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y metabólicos. Existen dos tipos de tejido adiposo en el organismo, blanco (*white adipose tissue*, WAT) y marrón (*brown adipose tissue*, BAT), que se diferencian tanto por su función como por el tipo de moléculas señalizadoras que liberan (adipoquinas en WAT vs. Batoquinas en BAT) (Amaia Rodríguez *et al.*, 2015; Villarroya *et al.*, 2017). En el presente trabajo, hemos centrado nuestros estudios en WAT, que se encarga de almacenar el exceso de energía producido durante la ingesta en forma de triglicéridos (TGs), los cuales son acumulados a nivel

intracelular en el adipocito, o liberados al torrente sanguíneo en forma de ácidos grasos y glicerol durante periodos de ayuno y/o aumento de la demanda energética (Rosen & Spiegelman, 2006; Scherer, 2019; Stephens, 2012).

Con respecto a las adipoquinas secretadas por WAT, incluye proteínas muy diversas que cumplen un rango heterogéneo de funciones, incluyendo, entre otras, la regulación del sistema inmune (Interleuquinas,  $TNF\alpha$  y MCP-1), del apetito y la ingesta (leptina), metabolismo lipídico (RB- 4 y CETP), homeostasis glucídica (adiponectina, resistina, visfatina), angiogénesis (VEGF), regulación de la presión sanguínea (angiotensinógeno), hemostasia vascular (PAI-1), factores de crecimiento (TGF $\beta$ ) y proteínas de fase aguda y respuesta al estrés (haptoglobulina y 1a-acid glycoprotein) (Dutheil *et al.*, 2018; Molica *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2015). Por otra parte, WAT se distribuye en dos localizaciones principales: visceral (TAV) y subcutáneo (TASC). Mientras que TAV se asocia comúnmente al desarrollo de patologías metabólicas como la diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Shuster *et al.*, 2012), se ha propuesto que TASC podría cumplir una función protectora sobre el metabolismo lipídico en condiciones de obesidad, al servir como almacén del exceso de lípidos que ocurre en dichas condiciones (Tran & Kahn, 2010). De igual forma, se ha descrito que la distribución de WAT puede variar con respecto a la edad, sexo o factores genéticos. Si bien se observa una relación directamente proporcional entre la edad y la masa de grasa intraabdominal, también se ha descrito que los hombres tienden a acumular la grasa en regiones superiores (morfología androide) mientras que las mujeres lo hacen en la parte inferior del cuerpo (morfología ginoide) (Okosun *et al.*, 2015).

Los adipocitos, células especializadas en la acumulación de lípidos, son el principal componente del tejido adiposo. La diferenciación de las células precursoras de los adipocitos presentes en el tejido adiposo, los preadipocitos, constituye un proceso complejo en el que intervienen de manera destacada tanto el receptor nuclear PPAR $\gamma$  como diversos miembros de la familia de factores de transcripción C/EBP (Ghaben & Scherer, 2019; Vanessa Pellegrinelli *et al.*, 2016; Pyrina *et al.*, 2020). Los preadipocitos y células madre mesenquimales presentes en el tejido adiposo conforman, junto con células endoteliales y una variedad de células inmunes, incluyendo macrófagos,



linfocitos y neutrófilos, la denominada fracción de estroma vascular (Elgazar-Carmon *et al.*, 2008; Kintscher *et al.*, 2008; Tchoukalova *et al.*, 2004). La proporción de cada uno de estos tipos celulares puede variar, además de en relación con la edad, conforme al grado de inflamación y localización del tejido adiposo (Rosen & Spiegelman, 2014; Russo & Lumeng, 2018). De hecho, está ampliamente aceptado que la obesidad se asocia con un estado de inflamación crónica de bajo grado (Kane & Lynch, 2019; Lu *et al.*, 2019; Schipper *et al.*, 2012). El mantenimiento de un estado inflamatorio de manera crónica en obesidad provoca a su vez un desequilibrio en la proporción de células del sistema inmune, favoreciendo tanto un mayor grado de infiltración del tejido adiposo por parte de los macrófagos como cambios en el fenotipo de estos a un perfil pro-inflamatorio (Christiansen *et al.*, 2005; Orecchioni *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2014). Las células del sistema inmune son críticas para el correcto funcionamiento del tejido adiposo en individuos sanos, por lo que la inflamación del tejido adiposo es considerada como un importante desencadenante de la disfunción metabólica asociada a obesidad (Crewe *et al.*, 2017; DiSpirito & Mathis, 2015).

Por otra parte, la capacidad de los adipocitos para incrementar su tamaño (hipertrofia) o su número y proporción (hiperplasia) constituye un mecanismo adaptativo esencial del tejido para poder afrontar una ingesta calórica excesiva de manera crónica. En condiciones normales, el volumen de los adipocitos está regulado por un balance entre los procesos de acumulación (lipogénesis) e hidrólisis de lípidos (lipólisis). Por su parte, el número de adipocitos está determinado por un balance entre los mecanismos de proliferación y los de regeneración celular por apoptosis. No obstante, en condiciones de obesidad, se produce una expansión alterada del tejido adiposo, lo que conlleva a la aparición de varios procesos patogénicos entre los que se incluyen la presencia de adipocitos hipertróficos y disfuncionales y el desarrollo de fibrosis e hipoxia, además del estado de inflamación mencionado anteriormente (Arner *et al.*, 2010; Crewe *et al.*, 2017; Datta *et al.*, 2018; Kahn *et al.*, 2019; Weyer *et al.*, 2000). Estos procesos conducen a una limitación en la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo, provocando que sean redirigidos a otros tejidos como el músculo esquelético o el hígado y desencadenen el desarrollo de resistencia a insulina y enfermedad metabólica (Carobbio *et al.*, 2017;

Danforth, 2000; Slawik & Vidal-Puig, 2007; Virtue & Vidal-Puig, 2010). En resumen, la obesidad puede definirse como una patología compleja y multifactorial en la que se produce una disfunción del tejido adiposo por intervención de numerosos mecanismos patogénicos (hipertrofia celular, inflamación, fibrosis o hipoxia) cuyas bases moleculares no son aún del todo conocidas. Por tanto, la identificación de marcadores asociados al desarrollo de enfermedades metabólicas en obesidad resulta esencial para profundizar en el conocimiento de esta patología y poder desarrollar estrategias dirigidas al diagnóstico y tratamiento de sus comorbilidades.

En este contexto, las tecnologías ómicas han contribuido a alcanzar un mayor grado de comprensión sobre el alcance y complejidad de la desregulación presente en obesidad y síndrome metabólico (Han, 2016). En particular, los recientes avances obtenidos en técnicas analíticas de separación de biomoléculas, así como su combinación con la espectrometría de masas, han permitido detectar una gran variedad de especies lipídicas de manera rápida, sensible y fiable, usando una cantidad de muestra mínima (Blanksby & Mitchell, 2010; Han *et al.*, 2012). La identificación y cuantificación de lípidos en muestras biológicas es un tema de interés en el ámbito de la investigación biomédica (Rustam & Reid, 2018) en general y, de manera más particular, en el campo de la obesidad, así como en las patologías asociadas (Hammarstedt *et al.*, 2018). Aunque los estudios iniciales eran limitados en cuanto al tamaño y cobertura del lipidoma identificado, estudios poblacionales más recientes usando muestras de suero o plasma, han revelado roles potenciales para una amplia variedad de especies de lípidos en el desarrollo y evolución de la enfermedad metabólica (Meikle & Summers, 2017). De igual manera, los mecanismos fisiológicos que conllevan a una alteración de la homeostasis lipídica en obesidad son complejos ya que involucran a un elevado número de especies lipídicas y sus rutas metabólicas de biosíntesis están interconectadas (Meikle & Summers, 2017). No obstante, se ha propuesto un papel para muchos esfingolípidos (ELs) y éter-fosfolípidos (EFLs) como componentes críticos en el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina o diabetes tipo 2 sobre la base de los cambios observados en sus niveles plasmáticos basales (y, según algunos escasos estudios, en órganos metabólicos como hígado y tejido adiposo) en dichas condiciones (Meikle & Summers, 2017). El conocimiento de los mecanismos que regulan la biosíntesis de estas formas lipídicas

podría servir para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas en obesidad y enfermedad metabólica. Por tanto, el objetivo principal de la presente Tesis doctoral ha sido identificar los cambios, cuantitativos y cualitativos, que afectan al lipidoma del tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a insulina, así como las posibles alteraciones que ocurren en las rutas de biosíntesis de los lípidos modificados en dichas condiciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este objetivo general, hemos empleado múltiples estrategias para analizar el lipidoma del tejido adiposo en modelos murinos y humanos de obesidad, tanto a nivel cualitativo y cuantitativo como a nivel de distribución espacial de los lípidos presentes en dichos tejidos. También hemos analizado las rutas implicadas en la biosíntesis de ELs y EFLs en respuesta a procesos patogénicos asociados al desarrollo de resistencia a insulina en obesidad mediante el uso de modelos de adipocitos *in vitro*.

Para investigar los cambios que se producen en el perfil y distribución espacial del lipidoma del tejido adiposo, se emplearon muestras congeladas de tejido adiposo subcutáneo (TASC) murino y humano, a los que se aplicó la técnica de espectrometría de masas de imagen, *matrix-assisted laser desorption ionization- Imaging Mass Spectrometry* (MALDI-IMS). En la optimización de cada una de las etapas de la técnica de MALDI-IMS se emplearon muestras de un modelo murino de obesidad mórbida inducido por dieta y tamaño de la camada previamente desarrollado por investigadores del IMIBIC (Novelle et al., 2017; Sánchez-Garrido et al., 2015). Los cortes seriados fueron obtenidos mediante el uso de un criostato y montados por descongelación sobre portaobjetos estándar para su tinción con hematoxilina/eosina o sobre portaobjetos conductivos ITO solos o en combinación con una cinta adhesiva de carbono, para su análisis por MALDI-IMS. Los experimentos de deposición de la matriz de ionización se hicieron empleando tres protocolos distintos (sublimación, estación robótica de sprayer y deposición seca) y cuatro matrices con propiedades y modos de ionización diferentes (DHA, DHB, DAN y MBT). Los espectros fueron obtenidos en polaridad positiva, usando un espectrómetro de masas 5800 MALDI-TOF/TOF en un rango  $m/z$  de 350 a 1100, con

una resolución lateral de 150  $\mu\text{m}$  entre píxeles. En la calibración interna de los espectros se emplearon los reactivos comerciales Bradiquinina (BF1-7) y Angiotensina (AT2).

Como complemento a los estudios de MALDI-IMS, se usó un sistema de cromatografía líquida acoplado o bien a un espectrómetro de masas híbrido (QTOF) o bien a un analizador de tipo triplecuadrupolo (QqQ), que fueron aplicados a extractos lipídicos obtenidos a partir de muestras de tejido adiposo. Para ello, se llevó a cabo de manera previa un proceso de optimización de la extracción de lípidos a partir de dichas muestras, empleando dos tipos de extractantes en ratios distintos (MTBE y CM) y un protocolo de extracción sólida de la muestra (SPE).

Para la caracterización de la huella lipídica asociada al desarrollo de obesidad y resistencia a insulina en tejido adiposo humano, se emplearon muestras de individuos obesos mórbidos normoglucémicos, insulinoresistentes y diabéticos tipo 2 (clasificados según criterios de la *American Diabetes Association* (ADA, 2019). Con respecto a las rutas implicadas en la biosíntesis de ELs y EFLs, hemos empleado la línea celular de adipocitos 3T3-L1, que fueron analizados durante el proceso de diferenciación inducido mediante exposición a cóctel hormonal. Usamos además dos modelos *in vitro* que mimetizan dos procesos patogénicos asociados a obesidad: hiperglucemia/hiperinsulinemia, mediante exposición de los adipocitos 3T3-L1 a altas concentraciones de glucosa (4,5 g/L) e insulina (100 nM) (24 h), o de inflamación, por exposición a  $\text{TNF}\alpha$  (5 nM, 24 h). El análisis de la expresión proteica se hizo por medio de *immunoblotting* de las enzimas implicadas tanto en el proceso de adipogénesis (Días 0-3-6-9) como tras la exposición a ambos tratamientos (HGHI y  $\text{TNF}\alpha$ ). Finalmente, la evaluación de los niveles de expresión génica de los genes seleccionados se hizo mediante PCR a tiempo real, utilizando el sistema LightCycler® 96.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las últimas décadas se ha incrementado el interés por investigar los mecanismos que subyacen en el desarrollo de obesidad, así como en la búsqueda de biomarcadores útiles que permitan predecir las alteraciones patológicas que se producen en el tejido adiposo y otros tejidos relacionados (Aleksandrova *et al.*, 2020; López-Villar *et al.*, 2015; Peinado *et al.*, 2014). En este contexto, las técnicas ómicas han predominado en el campo de la

investigación clínica, encontrándose tanto estudios genómicos y transcriptómicos como de tipo proteómico en modelos animales y humanos de obesidad (Novelle *et al.*, 2017; Aleksandrova *et al.*, 2020). Sin embargo, mientras que se han llevado a cabo varios estudios proteómicos relacionados, incluyendo la caracterización de los componentes del tejido adiposo (Peinado *et al.*, 2011; Diaz-Ruiz *et al.*, 2015; Guzman-Ruiz *et al.*, 2020), o la repuesta a la pérdida de peso tras cirugía bariátrica (Moreno-Castellanos *et al.*, 2016), los estudios de lipidómica del tejido adiposo son más limitados, a pesar de que los lípidos son componentes esenciales del organismo (Fuchs, 2014). Gracias a los recientes avances en el campo de la lipidómica, se han podido elucidar algunos de los mecanismos que participan en la desregulación lipídica que ocurre en obesidad y el desarrollo de enfermedad metabólica (Han, 2016). Precisamente, la lipidómica basada en espectrometría de masas está emergiendo como una potente herramienta analítica para investigar los cambios que se producen en la composición lipídica del tejido adiposo de modelos animales y humanos. En concreto, se han publicado algunos estudios relacionados con la obesidad, principalmente en muestras de suero y, en menor medida, sobre muestras de tejido (Henstridge & Bozaoglu, 2017). Sin embargo, hasta la fecha sólo se ha publicado un estudio lipidómico, muy recientemente, que analiza la distribución espacial de lípidos en este tipo de tejidos, altamente enriquecidos en lípidos (Fournelle *et al.*, 2020). Por ello, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se han desarrollado y aplicado múltiples estrategias para llevar a cabo un análisis de la composición y distribución espacial del lipidoma del tejido adiposo. De esta forma, se pretende contribuir al estudio de la obesidad y resistencia a insulina, aportando nuevas herramientas analíticas que permitan dilucidar los mecanismos fisiopatológicos que se desregulan como consecuencia del desarrollo de enfermedad metabólica.

La versatilidad de la técnica de MALDI-IMS para mapear cambios en la distribución de numerosos analíticos ha sido puesta de manifiesto en numerosas patologías (Korte *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2012; Stoeckli *et al.*, 2001). Sin embargo, su aplicación en tejidos altamente enriquecidos en lípidos, como el tejido adiposo, carente de una estructura compacta y con una morfología blanda, dificultaba su aplicación, presumiblemente por la falta de protocolos adaptados y eficientes. En este tipo de muestras, se presenta un

gran desafío ya que los lípidos se movilizan al entrar en contacto con la matriz de ionización, impidiendo así el análisis de sus posiciones originales dentro del tejido. En consecuencia, en este trabajo se describen todas las estrategias llevadas a cabo para adaptar cada una de las etapas críticas de preparación de la muestra a las propiedades intrínsecas del tejido adiposo, incluyendo métodos de seccionamiento del tejido y de deposición de la matriz de ionización. Para la obtención de cortes seriados se probaron tanto estrategias de corte en seco como sobre muestras embebidas en soluciones de polímeros para reforzar su estructura. Por su parte, para la deposición de la matriz se emplearon cuatro matrices (DAN, MBT, DHA y DHB), ampliamente utilizadas en el análisis de lípidos (Leopold *et al.*, 2018; Thomas *et al.*, 2012; Perry *et al.*, 2020) pero, al aplicarlas sobre la muestra por medio de diferentes estrategias de deposición (sublimador, estación robótica de sprayer y deposición seca), se produjo una difusión de lípidos en todos los casos. Asimismo, el uso de superficies alternativas para la deposición de la muestra, previamente descritas en otros estudios (König, 2008; Nimesh *et al.*, 2013; Norris & Caprioli, 2013; Zavalin *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012) resultaron ser inefectivas en la contención de los lípidos de la muestra. Finalmente, el uso de una cinta de carbón conductiva de carbón, previamente descrita en estudios de MALDI-IMS de proteínas con secciones completas de otros tejidos (Anderson *et al.*, 2015; Khatib-Shahidi *et al.*, 2006) resultó determinante tanto para preservar la estructura anatómica del tejido como para minimizar la difusión de los analitos presentes en la muestra.

Dado que se ha descrito que el método de aplicación influye de manera directa sobre la calidad de los espectros, se optimizó tanto la solución de la matriz como la forma de deposición sobre la muestra (simple o combinada). Está ampliamente aceptado que factores como la manipulación de la muestra, la supresión iónica o la normalización, pueden influir sobre la cuantificación de las imágenes obtenidas por espectrometría de masas (Irie *et al.*, 2014; Shobo *et al.*, 2016; Stepanka *et al.*, 2019). Por ello, nuestros análisis fueron respaldados por LC-MS/MS para concederle un mayor grado de robustez a las anotaciones lipídicas. Como paso previo, se llevó a cabo una optimización del protocolo de extracción de lípidos, en la que se probaron distintos extractantes (MTBE y CM) y dos tipos de analizadores (QTOF y QqQ). Los resultados obtenidos nos permitieron establecer el lipidoma del TASC de rata, en el cual detectamos una

predominancia (57% del lipidoma total) de formas de fosfatidilcolina (PCs, Liso-PCs, PC-Os y PC-Ps) así como una proporción elevada de SMs (9% del lipidoma total). En conclusion, en este trabajo hemos establecido por primera vez una metodología específica para el análisis de secciones de tejido adiposo mediante MALDI-IMS en la que se incluyen estrategias complementarias de validación y anotación mediante LC-MS/MS. Para llevarlo a cabo, en nuestro protocolo las secciones fueron depositadas sobre una cinta de carbón conductiva y posteriormente recubiertas con la matriz DHB como paso previo a su análisis. Una vez validado nuestro protocolo, se analizó el perfil lipídico de modelos de obesidad animal inducida por dieta (dieta alta en grasa, HFD) y tamaño de camada. Estos estudios permitieron revelar importantes diferencias en la composición del lipidoma asociado al tejido adiposo durante el desarrollo de obesidad. En concreto, los resultados mostraron que la combinación de ambos efectos obesogénicos, camada pequeña y HFD, producían una remodelación del perfil lipídico en TASC, así como un incremento de la concentración total de lípidos, al mismo tiempo que sugerían que cada familia de lípidos se encuentra regulada de manera independiente por mecanismos que podrían asociarse a la función que cumplen dentro del tejido. Notablemente, observamos cambios significativos en la proporción de PLs constituidos por colina (LPC-Ps y PC-Ps) así como un descenso numérico, aunque no significativo, en la concentración total de lípidos estructurales de la membrana plasmática (PEs y SMs) y señalizadores (PIs), si bien se encontraron diferencias en especies representativas de dichas familias. En este contexto, gracias a las imágenes obtenidas por MALDI-IMS, pudimos monitorizar los cambios en la zonación de las especies lipídicas SM(d18:0\_18:2), PC(O-16:0\_16:1) y PE(P-16:0\_20:0). De esta manera, la especie SM(d18:0\_18:2), aumentada en los animales obesos, estaba enriquecida en áreas ocupadas mayoritariamente por adipocitos, mientras que PC(O-16:0\_16:1) y PE(P-16:0\_20:0), con niveles reducidos en animales obesos, se correlacionaban con la fracción de estroma vascular. En su conjunto, estos resultados refuerzan la hipótesis de que, durante la obesidad, se produce una desregulación de la composición de las membranas celulares, modificando la proporción de lípidos esenciales y estructurales como los plasmalógenos (PLs) y las esfingomielinas (SMs), lo que puede repercutir en funciones esenciales de la fisiología del adipocito como la señalización celular o el tráfico y metabolismo de lípidos.

De forma similar a lo observado en el modelo animal, el análisis del perfil lipídico de TASC de sujetos obesos con diferente grado de sensibilidad a insulina reveló una modificación del lipidoma asociado a los diferentes grupos de estudio. Por un lado, se observó que durante el desarrollo de IR/T2D se produce un incremento en el contenido total de lípidos, siendo destacable el aumento de glicerofosfolípidos en general y EFLs en particular. Asimismo, se detectó una disminución en el contenido de SMs en los grupos IR y T2D con respecto al grupo NG. Dadas las funciones ejercidas por estos lípidos (Santos & Preta, 2018), estos resultados sugieren que la remodelación de las membranas celulares, sobre todo en adipocitos hipertróficos, podría constituir un mecanismo adaptativo del tejido adiposo para facilitar su expansión durante el desarrollo de obesidad y enfermedad metabólica. Los cambios producidos en la conformación de la membrana plasmática servirían para contrarrestar el estrés mecánico al que se ven sometidas las células como consecuencia del desarrollo de fibrosis en el tejido, especialmente en los individuos obesos del grupo IR y T2D (Guzmán-Ruiz *et al.*, 2020). Por otro lado, los niveles de CERs experimentaron un descenso en el grupo IR, aunque aumentaron en el grupo T2D, sugiriendo que la desregulación de estas formas lipídicas podría ser un factor agravante del desarrollo de enfermedad metabólica (Kayser *et al.*, 2019; Sokolowska & Blachnio-Zabielska, 2019). Por su parte, los niveles de PLs aumentaron de manera significativa en los obesos con enfermedad metabólica, lo que podría interpretarse como un mecanismo de respuesta frente al estrés oxidativo que se produce en condiciones de IR y T2D. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que, al igual que ocurre con el estrés oxidativo, el perfil lipídico del tejido adiposo de obesos NG probablemente refleja una respuesta adaptativa de defensa celular frente a los insultos propios de la obesidad mientras que los cambios observados en la transición del fenotipo NG a IR corresponden o bien a la acumulación de lípidos con efectos citotóxicos o bien a la pérdida de lípidos con funciones protectoras en el tejido. En esta línea, los resultados obtenidos mediante MALDI-IMS permitieron discriminar diferencias en la huella lipídica asociada a cada uno de los grupos estudiados, detectándose un mayor número de especies significativas entre los grupos NG vs.T2D e IR vs. T2D. En concreto, en los obesos IR y T2D se detectaron cambios en prácticamente todas las familias de lípidos con respecto al grupo NG. Además, se observó un incremento significativo de los niveles de LPCs, LPEs y PAs en el grupo IR con respecto al grupo NG



Cabe destacar que la desregulación de formas liso se ha correlacionado con procesos inflamatorios en obesidad (del Bas *et al.*, 2016) mientras que el PA participa en los procesos de señalización de la insulina a través de los receptores mTOR (Fang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2012). Finalmente, la comparativa IR vs. T2D mostró diferencias significativas en la concentración de EFLs, glicerofosfolípidos y ceramidas, lo que podría indicar que estos lípidos están implicados en el empeoramiento de la enfermedad metabólica asociada a obesidad. En conjunto, estos resultados van en consonancia con lo observado en nuestros estudios sobre el modelos murino de obesidad (delgados vs. obesos IR por HFD y camada), donde estas familias de lípidos aparecen como marcadores de disfunción del tejido adiposo durante el desarrollo de enfermedad metabólica.

De manera complementaria a los resultados obtenidos a nivel cuantitativo, se llevó a cabo un análisis de zonación de TASC humano sobre algunas de las especies significativas que se detectaban entre los tres grupos de estudio. Los resultados mostraron que la esfingomielina SM(d18:1\_22:0), cuyos niveles eran más elevados en los grupos IR y T2D, se acumulaba de manera preferente en regiones ocupadas por adipocitos. Estos resultados van en consonancia con estudios previos, en los que se relacionaba un exceso de SMs con el desarrollo de resistencia a insulina (Li *et al.*, 2011) y enfermedad metabólica (Russo *et al.*, 2013; Sui *et al.*, 2019). En cambio, la distribución de los EFLs era más heterogénea en el tejido adiposo, a excepción de la especie PC(P-16:0\_20:5), que se asociaba su distribución a la fracción de estroma vascular en el grupo NG y cuyos niveles eran menores en la comparativa NG vs. IR, pero mayores en T2D. Puesto que se ha descrito que los PLs pueden participar en una multitud de procesos biológicos (Braverman & Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018), esta distribución diferencial con respecto a otras especies lipídicas de su misma familia podría sugerir una función más específica dentro del tejido adiposo.

En su conjunto, estos resultados indican que las condiciones fisiopatológicas que subyacen en el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina o diabetes tipo 2, promueven una modificación sustancial del lipidoma asociado al tejido adiposo, afectando de manera específica tanto a la concentración de especies de lipídicas como

a su distribución espacial en el tejido. Asimismo, nuestros resultados ponen de manifiesto que, a pesar de la complejidad y heterogeneidad presente en los estudios que emplean muestras biológicas de origen humano, el uso de nuestro protocolo optimizado de MALDI-IMS en muestras de tejido adiposo es de gran utilidad para predecir el estado fisiopatológico de cada grupo de pacientes en base a su perfil lipídico. A pesar de que aún se desconocen en su totalidad muchas de las rutas relacionadas con el metabolismo de especies lipídicas concretas, sí se ha avanzado en el conocimiento sobre las enzimas generales que participan en la biosíntesis de muchas familias de lípidos. De manera complementaria a los estudios lipidómicos, se llevó a cabo una caracterización de las enzimas implicadas en la biosíntesis de ELs y EFLs, puesto que presentaban una expresión diferencial en obesidad e IR. En relación a la biosíntesis de éter-lípidos, nuestros estudios mostraron un patrón temporal diferencial durante el proceso de adipogénesis, asociado a dos orgánulos que intervienen en dicho proceso biosintético: peroxisomas y retículo endoplásmico (Braverman & Moser, 2012). En este sentido, observamos que las enzimas que catalizan los primeros pasos de la biosíntesis de éter-lípidos en peroxisomas (FAR1, GNPAT, AGPS), mostraban niveles más elevados en etapas tempranas de la adipogénesis (i.e., al inicio de la acumulación de lípidos en gotas lipídicas). Por su parte, las enzimas localizadas en el RE (AGPAT3, CEPT1 y CHPT1), incrementaban sus niveles de expresión en fases más tardías. Asimismo, los resultados obtenidos en los modelos de resistencia a insulina *in vitro* sugieren que las condiciones de hiperglucemia/hiperinsulinemia y la inflamación que sufre el tejido adiposo en obesidad podría contribuir, mediante su efecto sobre los orgánulos celulares del adipocito, a la desregulación en la producción de EFLs, con importantes consecuencias potenciales en la fluidez de la membrana plasmática del adipocito y en su capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo (Wallner y Schmitz, 2011; Brites *et al.*, 2004).

Adicionalmente, dado que se ha descrito que los marcadores inflamatorios y de estrés del RE se encuentran elevados en pacientes que sufren obesidad (Pagliassotti *et al.*, 2016), nos propusimos analizar la expresión proteica de algunos marcadores de estrés oxidativo y del RE (BiP, GSS, CHOP, Catalasa). Por un lado, los resultados mostraron que todas las enzimas, excepto CHOP, que alcanza su pico de activación a día 6 de diferenciación, mostraban niveles de expresión elevados a partir del día 3 de

diferenciación, con niveles mantenidos en etapas posteriores. Por otro lado, las condiciones de HGHI afectaron en mayor medida al estrés del RE, disminuyendo el contenido proteico de BiP y aumentando los niveles de GSS, mientras que el tratamiento con TNF $\alpha$  alteró de manera significativa los niveles de catalasa y adiponectina, reduciendo las defensas antioxidantes y provocando una disfunción de los adipocitos. Con respecto a la biosíntesis de ELs, nuestros resultados de expresión mostraban un efecto diferencial sobre los compartimentos a los que se asocian las enzimas implicadas. Mientras que las SMs son producidas en el aparato de Golgi o en la membrana plasmática, las ceramidas pueden producirse a nivel intracelular en el RE, ser recicladas por mediación de los endolisosomas o sintetizarse en la membrana plasmática (Hannun & Obeid, 2018). En nuestros estudios, observamos que la mayoría de las enzimas experimentaron un cambio significativo en sus niveles de expresión a partir del día 3 de diferenciación celular, momento en el que las células comienzan a acumular gotas lipídicas. De igual forma, la expresión de estas enzimas alcanzó o bien su pico máximo o mínimo de expresión una vez el adipocito ha completado su maduración y, en consecuencia, se produce una mayor acumulación intracelular de lípidos. Por otra parte, los resultados de medida de expresión de las enzimas relacionadas con la biosíntesis de esfingolípidos en modelos *in vitro* de resistencia a insulina sugerían que mientras el tratamiento con HGHI podría favorecer la biosíntesis de SMs a nivel intracelular y CERs en la membrana plasmática, la exposición a TNF $\alpha$  provocaría un descenso generalizado de la expresión de todas las enzimas implicadas. En conclusión, estos resultados sugieren una regulación diferencial de cada ruta de biosíntesis de lípidos en respuesta a los diferentes procesos patogénicos que se activan en obesidad y que, en conjunto, contribuyen al desarrollo de resistencia a insulina.

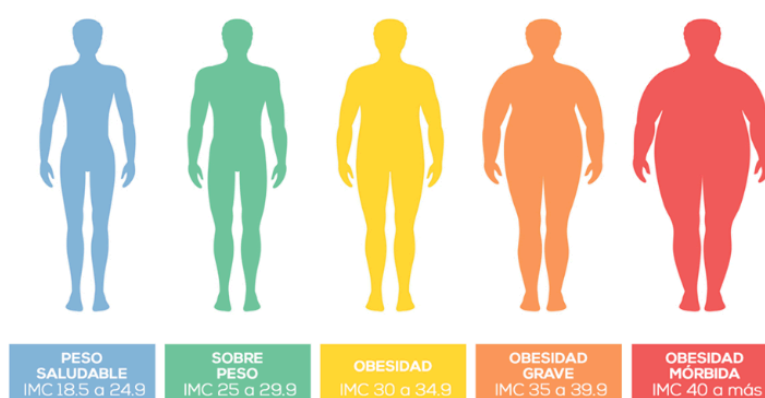


## INTRODUCCIÓN



## 1. Obesidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como un trastorno de acumulación excesiva de grasa que tiene efectos sobre la salud y que se diagnostica en individuos con un índice de masa corporal superior a  $30 \text{ kg/m}^2$  (Prospective Studies, 2009). No obstante, es una enfermedad compleja y multifactorial en cuyo desarrollo intervienen tanto factores genéticos y biológicos como socio-ambientales, incluyendo cambios en la alimentación y una disminución de la actividad física ("Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years," 2017).



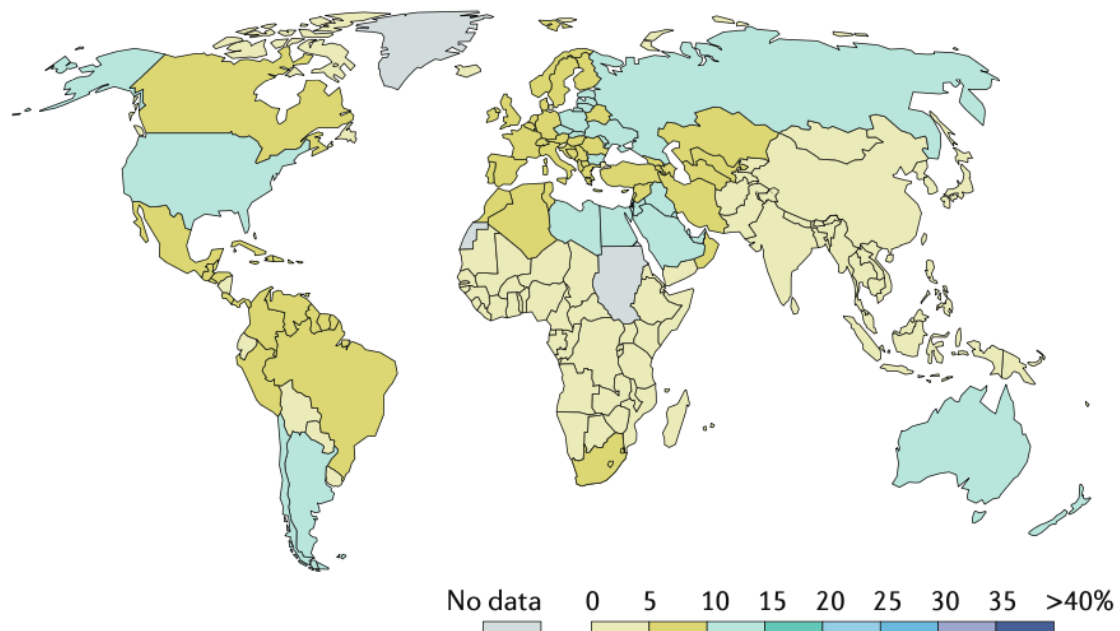
**Figura 1.** Evaluación del grado de obesidad conforme al índice de masa corporal. Fuente: *Center for Disease Control and Prevention (CDC, EE.UU.)*.

La obesidad representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (hipertensión, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular), metabólicas (diabetes mellitus tipo 2 e hígado graso) y ciertos tipos de cáncer (Amoretti et al., 2002; Czernichow et al., 2011; Singh et al., 2013). Además, está asociada con una disminución de la calidad de vida y en función del grado de severidad y sus comorbilidades, con una reducción de 5 a 20 años en la esperanza de vida (Fontaine et al., 2003). El aumento del consumo de alimentos ultraprocesados e hipercalóricos y la implantación generalizada de un estilo de vida más sedentario constituyen las principales causas de la evolución de este problema de salud y económico a nivel mundial ("Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years," 2017; Nyberg et al., 2018). De hecho, los ratios de prevalencia de obesidad y sobrepeso se han llegado a triplicar desde 1980 y actualmente se estima que en torno al 39% de la población mundial tiene sobrepeso u obesidad (Chooi et al.,

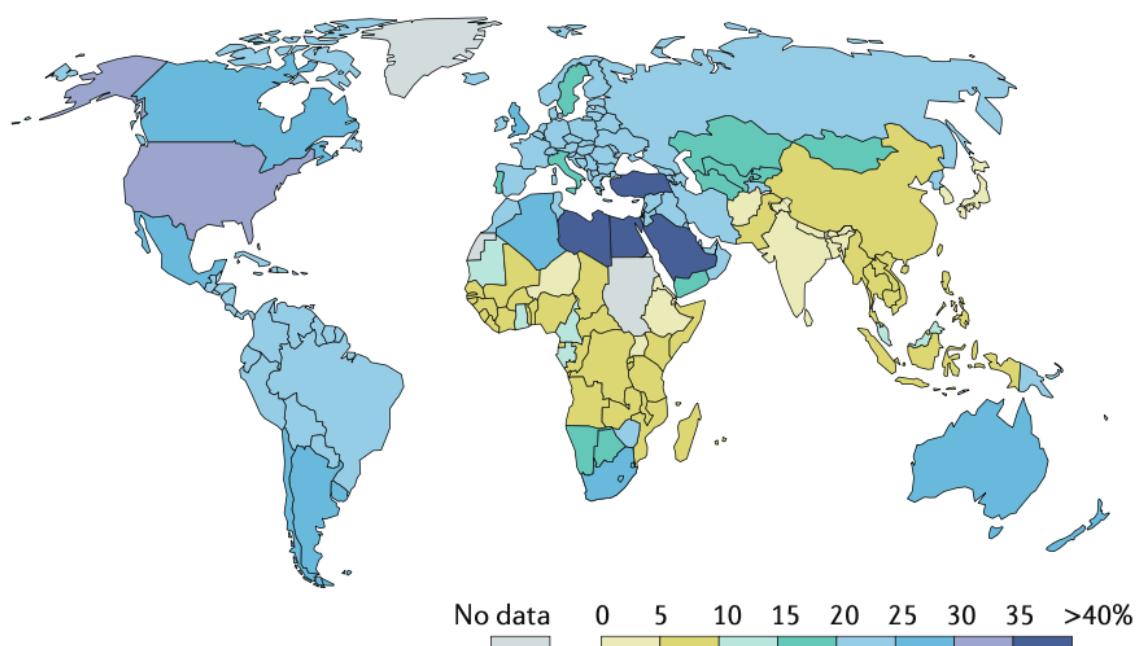
2019a). Así, se ha estimado que, de seguir la tendencia de crecimiento observada en las últimas décadas, en el año 2025 la prevalencia mundial de obesidad alcanzará el 18% en hombre y estará por encima del 21% en mujeres, mientras que la obesidad severa (i.e., mórbida) será superior al 6% y 9% en hombres y mujeres, respectivamente (NCD Risk Factor Collaboration, 2016).

A nivel global, la proporción de individuos con sobrepeso pasó del 25,4% al 38,5% en hombres y del 27,8% al 39,4% en mujeres, en el intervalo de tiempo comprendido entre 1980 y 2015 Chooi et al. (2019b). De igual forma, la prevalencia de obesidad pasó del 5% en 1980 al 10,1% obtenido en 2015 para el grupo de hombres y del 8,9% al 14,8% en mujeres. El análisis de los datos por regiones y países señaló a la Unión Europea y el continente americano como las regiones con mayor prevalencia de obesidad (22,9% y 28,3%, respectivamente) y sobrepeso (59,6% y 64,2%, respectivamente) (Chooi et al., 2019a). En cambio, la región Este del Pacífico y el Sudeste Asiático fueron las regiones con una menor prevalencia de obesidad (4,9% y 6,2%, respectivamente) y sobrepeso (28,2% y 24,3%, respectivamente).

**a Percentage of adults defined as obese, 1975**





**b Percentage of adults defined as obese, 2014**

**Figura 2. Incrementos en la prevalencia de obesidad a lo largo del tiempo.** La figura representa cómo el número de adultos con obesidad ha aumentado de forma alarmante en el transcurso de las últimas décadas. Los datos muestran el porcentaje de individuos obesos por cada país entre los años 1975 (a) y 2014 (b). Tomado de Blüher *et al.* (2019).

Las recomendaciones de salud actuales están basadas en el hecho de que, durante la obesidad, se produce una desregulación del balance entre la ingesta de calorías y el gasto energético (Oussaada et al., 2019). Desde el punto de vista evolutivo, el ser humano y sus predecesores tuvieron que sobrevivir en condiciones prolongadas de desnutrición, lo que favorecería la preservación de genotipos basados en la sobrealimentación y la contención del gasto energético por reducción de la actividad física. De esta manera, se promovieron aquellas variantes genéticas capaces de comer más rápidamente, reabsorber un alto número de calorías, y expandir las reservas de energía en el tejido adiposo de manera eficiente (Yanovski, 2018).

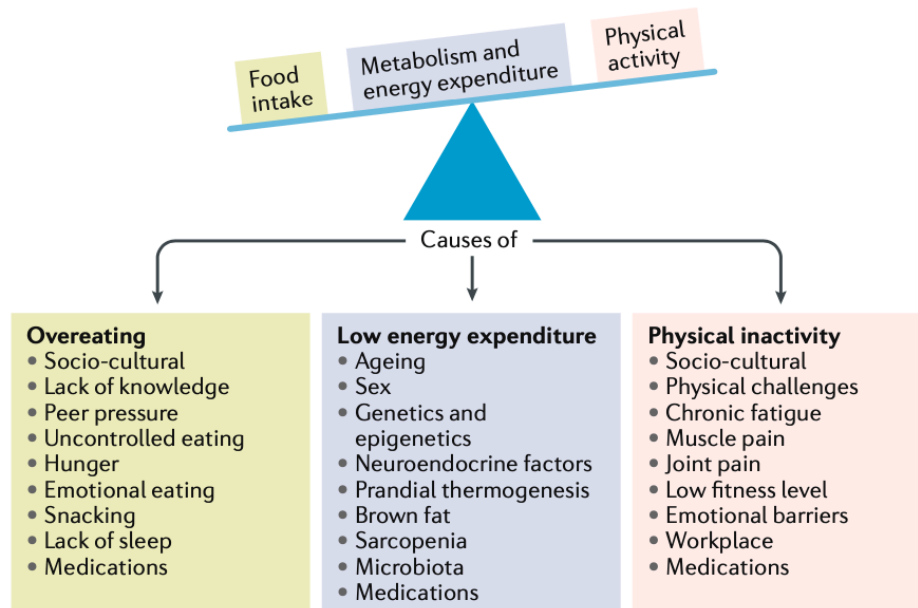


Figura 3. Factores que influyen en el balance energético y contribuyen al desarrollo de obesidad. La ganancia de peso se produce gracias a la combinación de los efectos de una sobrealimentación y un descenso del gasto energético junto a una inactividad física. Tomado de Blüher *et al.* (2019).

Actualmente, los esfuerzos en investigación se centran en el estudio de los mecanismos biológicos que subyacen en la obesidad, de tal manera que sea posible diseñar estrategias óptimas que conduzcan a mantener un peso corporal saludable. Para ello, se han estudiado tanto los mecanismos que controlan el apetito a nivel del sistema nervioso central como los que operan a nivel del tejido adiposo, el intestino o relacionados con la función hepática (Heymsfield & Wadden, 2017; Murray *et al.*, 2014). El papel clave de ciertas regiones del cerebro se hizo evidente gracias a los estudios con modelos animales que desarrollaban tumores en el hipotálamo y presentaban un comportamiento anormal en la búsqueda de alimentos (Anand & Brobeck, 1951; Farooqi, 2014). Por su parte, el descubrimiento de una mutación en el gen *ob* que codifica para la leptina y que causaba obesidad severa en ratones *ob/ob* (Coleman & Hummel, 1969), permitió establecer una relación causal entre los circuitos neurales del sistema nervioso central que controlan la homeostasis energética y la señal de tejidos periféricos como el tejido adiposo (Farooqi & O'Rahilly, 2014). En consonancia, se ha descubierto que ciertas mutaciones en los genes que codifican para la leptina (Farooqi *et al.*, 1999; Montague *et al.*, 1997) o su receptor (Clément *et al.*, 1998), pueden causar obesidad severa en humanos, sugiriendo la importancia de los factores biológicos en la patogénesis de la obesidad.

Por otra parte, los estudios llevados a cabo en individuos gemelos y de adopción sugirieron que la obesidad podría tener un componente genético, estimando un porcentaje de heredabilidad de entre el 40 y 70% entre individuos (Börjeson, 1976; Stunkard et al., 1990). Sin embargo, los estudios genéticos de asociación de todo el genoma (GWAS) revelaron que sólo el 2% de la variabilidad detectada en el IMC de los sujetos estudiados se debía a la presencia de polimorfismos comunes de un solo nucleótido (Hebebrand et al., 2010; Speliotes et al., 2010). Por tanto, estos resultados serían determinantes para confirmar que los factores genéticos no son suficientemente potentes para explicar el aumento de la prevalencia de obesidad observado a lo largo de las últimas décadas.

### 2. Tejido adiposo

El tejido adiposo ha sido considerado tradicionalmente un tejido de almacén de la energía en el organismo, así como mecanismo de aislamiento y protección mecánica para determinados órganos vitales. Sin embargo, en las últimas décadas ha cambiado radicalmente el concepto de tejido adiposo y hoy en día se acepta que es un tejido altamente dinámico, capaz de sintetizar y secretar numerosos factores no sólo de carácter lipídico sino también proteico, interviniendo de manera directa en la regulación de mecanismos fisiológicos y metabólicos.

En primer lugar, se describió que secretaba hormonas esteroideas (Whitworth & Meeks, 1985) y posteriormente, tras el descubrimiento de la leptina en 1994 (Zhang et al., 1994), se le reconoce su papel como órgano endocrino. Es a partir de entonces, cuando se han ido identificando los numerosos factores que se liberan por este tejido y que cumplen tanto funciones endocrinas como autocrinas y paracrinas [hasta 58 distintos, según Amaia Rodríguez et al. (2015)].

#### 2.2.- Tipos de tejido adiposo.

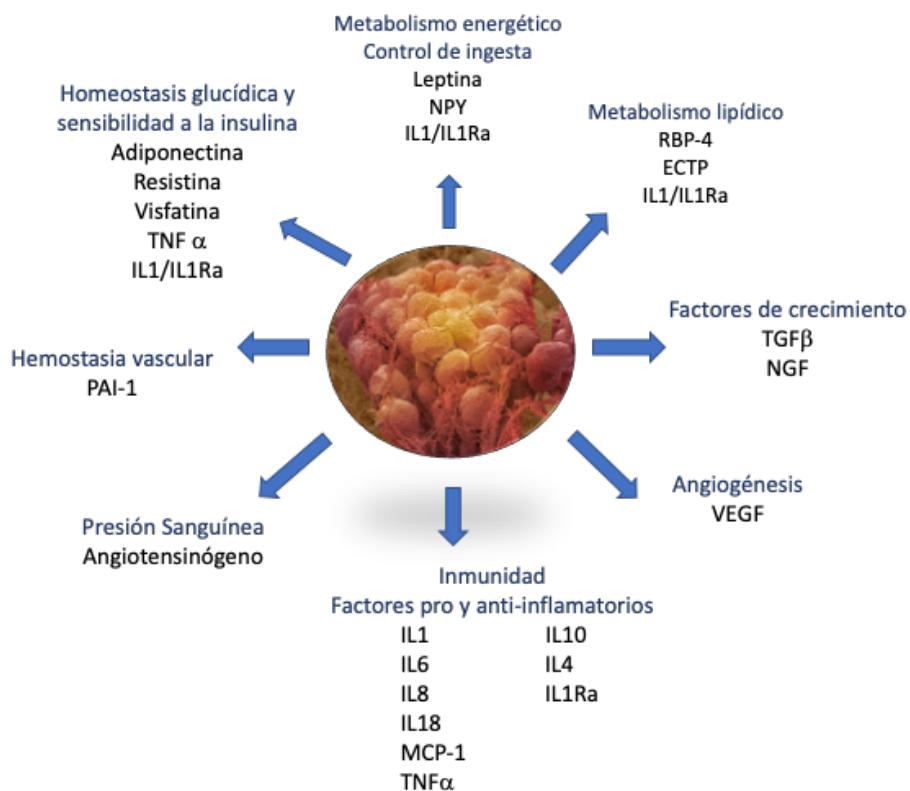
El tejido adiposo se divide en dos tipos principales: tejido adiposo blanco (*WAT: white adipose tissue*) y el tejido adiposo marrón (*BAT: brown adipose tissue*). Por un lado, el WAT es el principal tejido de almacén de energía del organismo y su función más conocida es la de transformar y almacenar el exceso de energía producido durante la ingesta en forma de triglicéridos (TGs) acumulados en el interior del adipocito (Scherer, 2019). No obstante, esta función puede revertirse en periodos de ayuno y/o incremento del gasto energético, liberando ácidos grasos y glicerol a través del torrente sanguíneo y transportándolos a otros tejidos, donde serán oxidados para obtener energía (Rosen & Spiegelman, 2006; Scherer, 2019; Stephens, 2012).

En contraste, el BAT cumple una misión fisiológica distinta, ya que se encarga de metabolizar los ácidos grasos con el fin de producir calor en respuesta al frío y las bajas temperaturas (Cannon & Nedergaard, 2004). Para llevar a cabo esta función requiere de la participación de la proteína *Uncoupling Protein-1* (UCP1), encargada de interrumpir

el acoplamiento de la cadena respiratoria a la ATP sintetasa, lo cual permite a su vez la liberación de calor (Cannon & Nedergaard, 2004). Estos dos tipos de tejido adiposo también se diferencian en las moléculas señalizadoras que liberan cada uno de ellos (adipoquinas en WAT vs. Batoquinas en BAT) (Amaia Rodríguez et al., 2015; Villarroja et al., 2017). Notablemente, estudios recientes han demostrado la existencia de adipocitos con capacidad termogénica en el WAT, los denominados adipocitos *beige* o *brite* (*brown-into-white*), que emergen en respuesta al frío ambiental y otros estímulos y que también participan en el mantenimiento tanto del tejido adiposo como de la homeostasis corporal (Scherer, 2019).

En relación con las adipoquinas secretadas por WAT, se trata de proteínas muy diversas en cuanto a estructura química y cumplen un rango heterogéneo de funciones fisiológicas. Muchas de estas funciones están relacionadas con el sistema inmune, ya que entre las adipoquinas figuran algunas interleuquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-4, IL-13), el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1). El descubrimiento de la relación del tejido con este tipo de proteínas permitió establecer un nexo entre inflamación y obesidad, ya que en condiciones de exceso de tejido adiposo se incrementa la secreción de adipoquinas proinflamatorias por parte de dicho tejido (Mathieu et al., 2009; Maximus et al., 2020; Molica et al., 2015).

Asimismo, entre las adipoquinas se incluyen también proteínas que intervienen en procesos como la regulación del apetito y la ingesta (leptina), metabolismo lipídico (RB-4 y CETP), homeostasis glucídica (adiponectina, resistina, visfatina), angiogénesis (VEGF), regulación de la presión sanguínea (angiotensinógeno) y hemostasia vascular (PAI-1), factores de crecimiento (TGF $\beta$ ) y proteínas de fase aguda y respuesta al estrés (haptoglobulina y 1 $\alpha$ -acid glycoprotein) (Dutheil et al., 2018; Molica et al., 2015; Amaia Rodríguez et al., 2015).



**Figura 4.** Procesos fisiológicos y metabólicos regulados por el WAT mediante la secreción de adipocinas. CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol; IL1: interleucina-1; IL1Ra: antagonista del receptor de la interleucina-1; IL4: interleucina-4; IL6: interleucina-6; IL8: interleucina-8; IL10: interleucina-10; IL18: interleucina-18; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1; NGF: factor de crecimiento nervioso; NPY: neuropéptido Y; RBP-4: proteína ligadora de retinol-4; TGFβ: factor de crecimiento transformante β; TNFα: factor de necrosis tumoral alfa; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular. Adaptado de Ràfols et al. (2014) y Rodríguez et al. (2015).

### 2.3.- Localizaciones del tejido adiposo

El esquema de clasificación más común del tejido adiposo distingue entre dos localizaciones principales de los depósitos de WAT: intraabdominal (TAI) y subcutáneo (TASC). Por un lado, el TAI incluye los depósitos omental, mesentérico, retroperitoneal, gonadal y pericárdico (Wajchenberg, 2000), que se asocian comúnmente a trastornos metabólicos como la diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, especialmente la grasa omental (Shuster et al., 2012). Por otro lado, el TASC se encuentra situado en varias localizaciones por debajo de la piel, incluyendo abdomen y la región gluteofemoral (Kwok et al., 2016) y se ha descrito que cumple una función protectora sobre el metabolismo lipídico (Tran & Kahn, 2010).

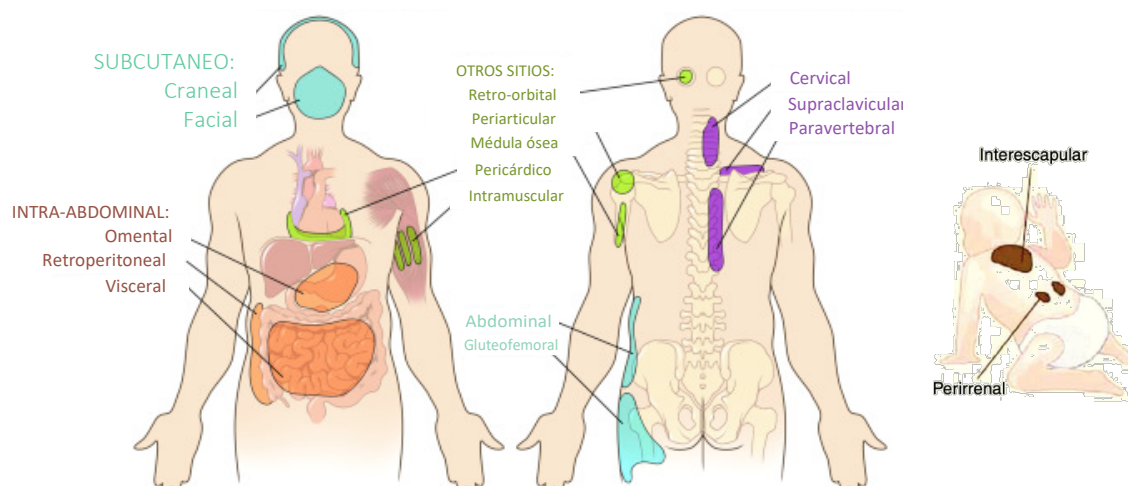


Figura 5. Distribución del WAT y BAT en humanos. Adaptado de Gesta *et al.* (2008) y Hepler *et al.* (2016)

De igual forma, se ha descrito que la distribución del WAT varía con la edad, el sexo o factores genéticos. Por un lado, se observa que al avanzar en edad se produce una mayor tendencia a incrementar la grasa intraabdominal, al mismo tiempo que se disminuye la subcutánea, incluso en individuos con peso e índice de masa corporal (IMC) estable (Esteve Ràfols, 2014). Con respecto al sexo, existe un dimorfismo sexual en cuanto a distribución de la grasa corporal ya que en mujeres predomina la acumulación de grasa en la parte inferior del cuerpo, conformando la denominada morfología ginoide o de tipo pera mientras que, en hombres, tiende a acumularse en las regiones superiores, lo que se conoce como morfología androide o de tipo manzana (Okosun *et al.*, 2015).

Por otra parte, el BAT se encuentra localizado mayoritariamente en las regiones cervical, supraclavicular y paravertebral (Hepler & Gupta, 2017), pero su presencia disminuye rápidamente tras el nacimiento y, hasta el descubrimiento de la *grasa beige*, sólo se consideraba significativo en el caso de pacientes con feocromocitoma (English *et al.*, 1973) o en sujetos expuestos de manera prolongada a condiciones hipotérmicas (Huttunen *et al.*, 1981). De hecho, los resultados obtenidos mediante tomografía por emisión de positrones (PET) en sujetos expuestos a climas extremos, permitió dilucidar que las regiones con *grasa beige* funcional son más frecuentes en mujeres que en hombres, así como que éstas van disminuyendo conforme avanza la edad y se correlacionan de manera inversa con el IMC, especialmente en población de edad

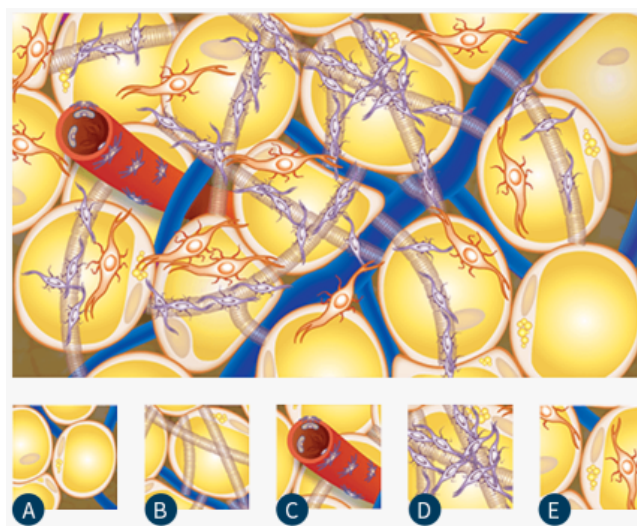
avanzada (Cypess et al., 2009). Estos resultados parecen evidenciar que el tejido adiposo *beige* posee funciones esenciales con respecto al metabolismo energético de humanos adultos y al mismo tiempo sugieren su posible uso como diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad.

En esta Tesis Doctoral hemos centrado nuestros estudios en WAT al que, a partir de este momento y por motivos de simplificación, nos referiremos como “tejido adiposo”.

### 2.4.- Componentes del tejido adiposo

Los adipocitos, células grandes especializadas en la acumulación de lípidos, son las células más representativas del tejido adiposo. Dado el tamaño de los adipocitos una vez alcanzan la madurez y las observaciones al microscopio óptico de secciones histológicas, se pensaba que eran las únicas células que componían ese tejido (Esteve Ràfols, 2014). Sin embargo, hoy en día se conoce que el tejido adiposo presenta una mayor heterogeneidad celular. En concreto, en torno al 60% del TASC y cerca del 80% del TAI corresponden a la denominada fracción del estroma vascular (Tchoukalova et al., 2004). Esta fracción está formada por preadipocitos y células madre mesenquimales, células endoteliales y una variedad de células inmunes, incluyendo macrófagos, linfocitos y neutrófilos (Elgazar-Carmon et al., 2008; Kintscher et al., 2008; Tchoukalova et al., 2004). Aunque se estima que el tejido adiposo de individuos obesos esta compuesto por un 10% de preadipocitos y un 10% de macrófagos, la proporción de los diferentes tipos celulares presentes en el estroma vascular puede variar conforme al grado de inflamación y la localización del tejido adiposo (Rosen & Spiegelman, 2014; Russo & Lumeng, 2018).





**Figura 6. Composición del tejido adiposo blanco.** (A) Adipocitos maduros (B) Matriz extracelular (C) Capilares sanguíneos (D) Estroma Vascular (E) Preadipocitos. Fuente: Adipose Tissue Regenerative Medicine Stem Cells. Derechos de autor: Robert W. Alexander y Steve Tatman.

De hecho, actualmente se acepta que existe una relación estrecha entre el sistema inmune y el tejido adiposo, de manera que la obesidad se asocia con un estado de inflamación crónica de bajo grado (Kane & Lynch, 2019; Lu et al., 2019; Schipper et al., 2012). Por una parte, la abundancia de macrófagos en el WAT está directa y proporcionalmente correlacionada con el tamaño del tejido adiposo (Curat et al., 2004; Lu et al., 2019). Asimismo, los macrófagos son los encargados principales de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por parte del tejido adiposo obeso, como  $\text{TNF}\alpha$  o las interleuquinas IL-6, IL-8 e IL-1b, por lo que están íntimamente relacionados con los estados de inflamación presentes durante el desarrollo de obesidad (Lu et al., 2019; Mathieu et al., 2009). Por otra parte, también se ha descrito que la respuesta del sistema inmune al estado de inflamación comienza con la activación de neutrófilos (Kane & Lynch, 2019). Estudios recientes con ratones obesos permitieron observar cómo en etapas iniciales de su alimentación con dieta alta en grasa, se produce una infiltración del WAT por parte de los neutrófilos mientras que en etapas tardías se produce una infiltración masiva por parte de los macrófagos (Elgazar-Carmon et al., 2008).

El mantenimiento de un estado inflamatorio de manera crónica, tal y como ocurre en obesidad, provoca un desequilibrio en la relación entre células pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, desencadenando a su vez que los macrófagos adquieran distintos

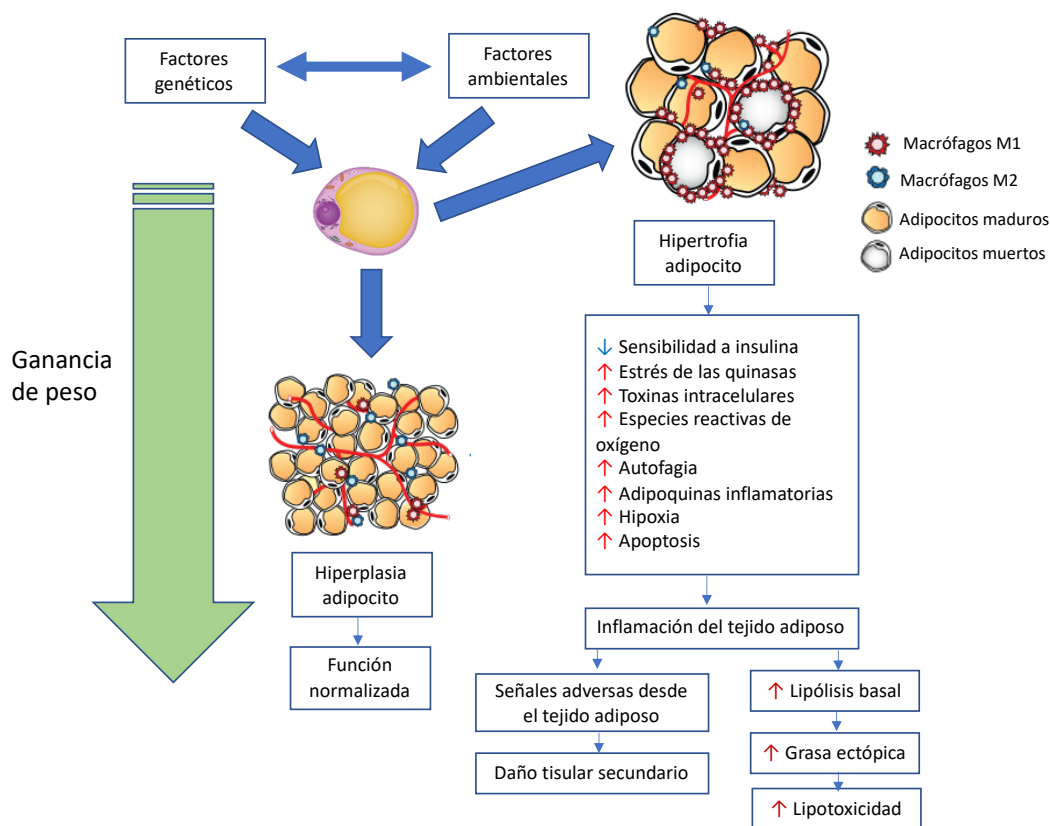
fenotipos en función de los estímulos que reciban (Orecchioni et al., 2019; Wang et al., 2014). De esta manera, los macrófagos activados son clasificados en tipo 1 (M1), con función pro-inflamatoria y acción microbicida; tipo 2 (M2), con propiedades antiinflamatorias y activados en respuesta a la liberación de IL-4 y/o IL-13 (tipo M2a), que pueden ser secretados por adipocitos (Gordon, 2003). También se ha descrito que la liberación de MCP-1 por parte de los adipocitos maduros, provoca un incremento del grado de infiltración del tejido adiposo por monocitos sanguíneos, favoreciendo así la acumulación de macrófagos característica del tejido adiposo obeso (Christiansen et al., 2005).

### 2.5.- Dinámica celular del tejido adiposo.

La cantidad de tejido adiposo en el adulto vendrá determinada por la capacidad de los adipocitos para incrementar su tamaño (hipertrofia) o su número y proporción (hiperplasia). Tradicionalmente, se consideraba que la hiperplasia en adultos sólo se producía cuando los adipocitos alcanzan su tamaño máximo, de manera que se estimulaba a una célula precursora y se generaba una nueva célula adiposa capaz de mantener la expansión del tejido adiposo. Sin embargo, hoy en día se acepta que este proceso esta fuertemente regulado por muchos factores y que estímulos obesogénicos como una dieta alta en grasa pueden generar la proliferación de células precursoras sin necesidad de una señal por parte de adipocitos hipertrofiados (Rosen, 2015).

En condiciones normales, el volumen de los adipocitos está regulado por un balance entre los procesos de acumulación (lipogénesis) e hidrólisis de lípidos (lipolisis), mientras que el número de adipocitos estará determinado por un balance entre proliferación y regeneración celular mediante apoptosis. De igual manera, la localización del tejido puede influenciar tanto en la capacidad de los preadipocitos para proliferar y diferenciarse como en su susceptibilidad a los mecanismos de apoptosis (Tchkonia et al., 2005). Estudios del grupo del Dr. Arner en el Instituto Karolinska permitieron establecer la capacidad de regeneración de los adipocitos en humanos, estimando una tasa anual de renovación en torno al 10% (Spalding et al., 2008). Estos investigadores demostraron que, a pesar de que la tasa de recambio de adipocitos era similar entre

individuos delgados y obesos, se observó un mayor número de adipocitos desde la infancia en individuos obesos.



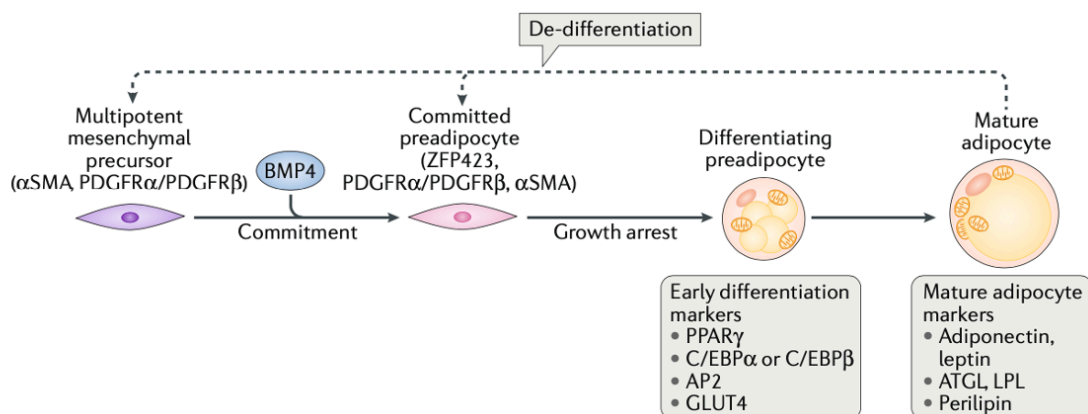
**Figura 7. Mecanismos de expansión del tejido adiposo.** Debido a la combinación de factores genéticos y ambientales, así como su interacción, algunos individuos aumentan los depósitos de grasa mediante los mecanismos de hipertrofia (incremento del tamaño del adipocito) e hiperplasia (aumento del número de adipocitos). No obstante, los individuos obesos suelen responder al balance energético positivo con la hipertrofia de sus adipocitos, provocando una disfunción del tejido adiposo y desarrollando una inflamación crónica del tejido que provocará daños colaterales en otra regiones del organismo. Adaptado de Klöting & Blüher (2014) y Choe *et al.* (2016)

## 2.6.- Mecanismos de diferenciación adipocitaria.

El proceso de diferenciación de los preadipocitos hasta convertirse en adipocitos maduros ha sido ampliamente estudiado (Ahmad *et al.*, 2020; Ghaben & Scherer, 2019). Este proceso se lleva a cabo por medio de cuatro fases principales, las cuales son coordinadas mediante un complejo mecanismo de regulación en el que interviene de manera destacada el receptor nuclear PPAR $\gamma$  y diversos miembros de la familia de factores de transcripción C/EBP (Ghaben & Scherer, 2019; Vanessa Pellegrinelli *et al.*, 2016; Pyrina *et al.*, 2020) (Fig. 8).

En primer lugar, una vez que las células madre mesenquimales que darán lugar a los preadipocitos adquieren dicho compromiso bajo la influencia del factor BMP, tiene lugar la fase de detención de la proliferación celular mediante mecanismos de inhibición por contacto, una señal física que indica que se ha alcanzado el grado de confluencia necesario para comenzar la diferenciación a adipocito. Acto seguido, se inicia la fase de expansión clonal, en la cual los preadipocitos sincronizan sus ciclos celulares por medio de varias divisiones mitóticas simultáneas. Una vez sincronizados, los preadipocitos comienzan la etapa de diferenciación temprana, en la cual expresan genes característicos del adipocito maduro (C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$ ) y se inician los procesos de acumulación de lípidos en su interior, activándose la transcripción de marcadores de los adipocitos como el transportador de glucosa, GLUT4, o la chaperona lipídica FABP4 (AP2).

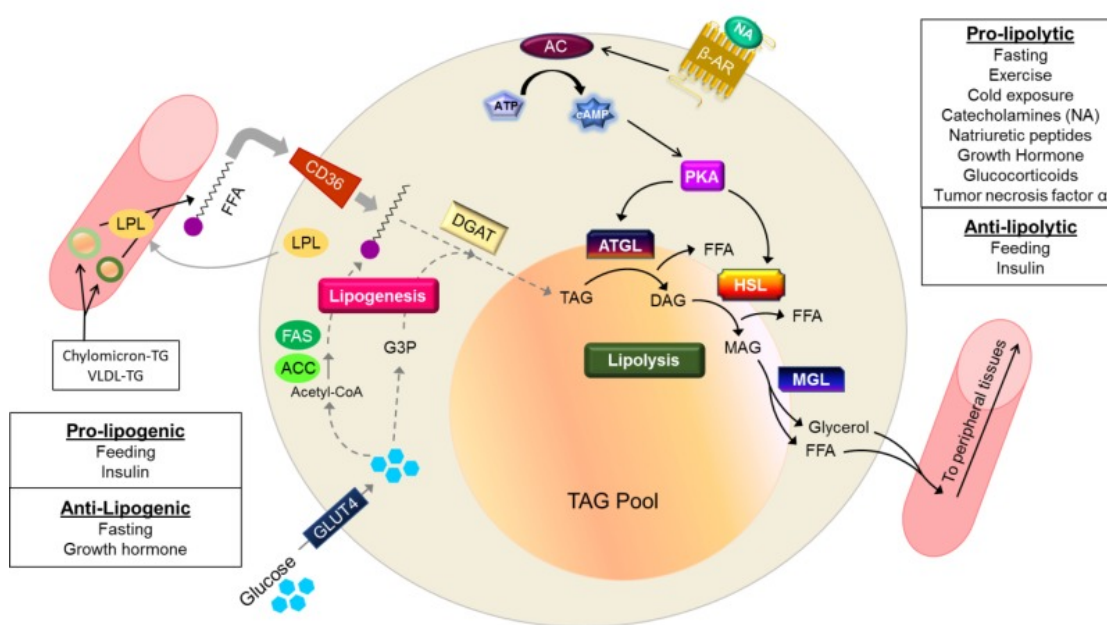
En ultimo lugar, se produce la fase de diferenciación terminal, en la cual tiene lugar una transcripción masiva de genes regulados por los factores de transcripción (C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$  y RXR $\alpha$ ), que están relacionados con la fisiología del adipocito maduro tales como las adipoquinas adiponectina o leptina, las enzimas ATGL y LPL, o la proteína asociada a las gotas lipídicas en adipocitos, perilipina 1 (Ghaben & Scherer, 2019).



**Figura 8. Esquema sobre la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros.** A. Fuente: Ghaben y Scherer (2019). Se indican los factores de transcripción relacionados con las diferentes fases que conducen la diferenciación de las células madre mesenquimales del tejido adiposo hasta adipocitos, y los marcadores que definen la diferenciación terminal de estas células. Fuente: Ghaben y Scherer (2019).

## 2.7.- Metabolismo lipídico en el tejido adiposo.

Como órgano de almacenamiento de energía, una de las funciones principales del tejido adiposo es la de acumular triglicéridos (TG) en las gotas lipídicas (lipogénesis) y liberar la energía almacenada en forma de ácidos grasos y glicerol en situaciones de demanda energética (lipólisis) para su uso como fuente de energía en otros órganos (Fig. 9) (Czech et al., 2013; Malagón et al., 2013; Moro et al., 2004). A nivel sistémico, la ingesta de alimentos estimula la vía lipogénica, almacenando TGs en el tejido adiposo, mientras que el ayuno favorece la vía lipolítica por medio de la cual se hidrolizan los TGs y se liberan los productos de hidrólisis al torrente sanguíneo.



**Figura 9. Mecanismos de regulación del metabolismo lipídico en adipocitos.** Para el correcto mantenimiento de la homeostasis energética y la sensibilidad a la insulina, debe establecerse un correcto balance entre la lipogénesis y la lipólisis en los adipocitos. La lipogénesis se muestra a la izquierda y las flechas grises marcan las rutas metabólicas relacionadas, mientras que la lipólisis se representa a la derecha y está marcada con flechas negras. . VLDL-TG: lipoproteína de muy baja densidad que contiene triglicéridos; LPL - lipoproteína lipasa; ACC - acetil-CoA carboxilasa 1; FAS - sintasa de ácidos grasos; G3P - fosfato 3 glicerol ; DGAT - diacilglicerol aciltransferasa;  $\beta$ -AR - receptor  $\beta$ -adrenérgico; NA - noradrenalina; AC - adenilil ciclasa; PKA - proteína quinasa A; ATGL - lipasa de triglicéridos de adipocitos; HSL - lipasa sensible a hormonas; MGL - monoacilglicerol lipasa; TAG - triacilglicerol; DAG - diacilglicerol; MAG - monoacilglicerol. Fuente: Richard *et al.* (2020).

### 2.7.1.- Lipogénesis.

La lipogénesis incluye el proceso de síntesis de novo de ácidos grasos a partir de acetil-coenzima A (acetil-CoA) (Ameer et al., 2014). La glucosa proporciona el sustrato para la síntesis de ácidos grasos, e induce la expresión de la enzima lipogénica acetil-CoA carboxilasa (ACC), estimulando la liberación de insulina por parte del páncreas. Como resultado, la insulina estimula la captación de glucosa por parte de los adipocitos, de manera que se activan tanto las enzimas glucolíticas y lipogénicas como la expresión de la proteína SREBP1, encargada de la síntesis de colesterol, ácidos grasos, TGs y fosfolípidos (Assimakopoulos-Jeannet et al., 1995; Ferré & Foufelle, 2007). Además de SREBP1, también se produce la activación de factores de transcripción como ChREBP, el cual promueve la lipogénesis de novo (DNL), modula el metabolismo tanto de lípidos como de glucosa en el tejido adiposo y regula la sensibilidad a insulina en todo el cuerpo (Eissing et al., 2013; Herman et al., 2012). Sin embargo, en condiciones normales, el DNL es relativamente bajo en WAT en comparación con el hígado y BAT en roedores e incluso más bajo en humanos (Letexier et al., 2003; Swierczynski et al., 2000), aunque se acepta actualmente que este proceso es importante tanto en el mantenimiento de la homeostasis de WAT (Ameer et al., 2014) como en la maduración de los adipocitos humanos (Collins et al., 2011).

Por otra parte, los ácidos grasos utilizados para la biosíntesis de TGs en los adipocitos provienen del torrente sanguíneo, tras la absorción de los ácidos grasos en el intestino y su empaquetamiento en lipoproteínas. En este proceso, es fundamental la participación de la lipoproteína lipasa (LPL), sintetizada por los adipocitos y traslocada posteriormente a las células del endotelio capilar, que libera los ácidos grasos procedentes de los TGs almacenados en las lipoproteínas circulantes (Kersten, 2014). Los adipocitos incorporan los ácidos grasos mediante proteínas como las transportadoras de ácidos grasos (FATP1 y FATP4), translocasas de ácidos grasos (FAT/CD36) y proteínas de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática (FABPpm) y citosólicas (FABP4, FABP5) (Frühbeck et al., 2014; Lafontan, 2008; Thompson et al., 2010). En el interior celular, los FFA son activados e incorporados en TGs mediante la acción de enzimas del retículo endoplásmico (GPAT, AGPAT, lipin, DGATs), los cuales son

finalmente almacenados en las gotas lipídicas de los adipocitos (Wilfling et al., 2013). Los TGs, junto con otros lípidos neutros, constituyen el núcleo hidrofóbico de las gotas lipídicas, que están rodeadas por una monocapa de fosfolípidos a la que se asocian diversas proteínas (Gross & Silver, 2014; Kory et al., 2016; Walther & Farese, 2012). Entre éstas, se encuentran enzimas relacionadas con la síntesis de TGs (DGAT2) o fosfolípidos (ACSL1, CCT $\alpha$ ), lipasas (HSL, ATGL) o las perilipinas, que regulan el almacenamiento e hidrólisis de los TGs (Gross & Silver, 2014; Kory et al., 2016; Olzmann & Carvalho, 2019; Walther & Farese, 2012; Xu et al., 2018).

Todo el proceso de acumulación de lípidos en los adipocitos está regulado por la insulina, ya que promueve la absorción y esterificación de ácidos grasos por medio de la activación de LPL, la inducción de la proteína transportadora de ácidos grasos y la regulación positiva de los genes relacionados con la lipogénesis (Dimitriadis et al., 2011; "Growth Hormone and the Mobilization of Fatty Acids," 1960; O'Brien & Granner, 1996). Otras hormonas que participan en la regulación de la lipogénesis en el tejido adiposo son hormona del crecimiento (GH) y la proteína estimulante de la acilación (ASP). Mientras que GH suprime la lipogénesis regulando los mecanismos de sensibilidad a la insulina o la señalización Stat5 (Etherton, 2000; Teglund et al., 1998), la proteína ASP actúa aumentando la síntesis de TGs mediada por enzimas clave en la esterificación de ácidos grasos, DGATs, e induciendo el almacenamiento de grasa subcutánea en hembras (A. Saleh et al., 2011).

#### 2.7.2.- Lipólisis.

La lipólisis es el proceso catabólico mediante el cual los TGs almacenados en el adipocito son hidrolizados hasta ácidos grasos libres y glicerol y posteriormente liberados a la circulación sanguínea en periodos de demanda energética (Carmen & Víctor, 2006; Langin, 2006; Zechner et al., 2005). Este proceso es inducido por el ayuno y aporta tanto glicerol, requerido para la gluconeogénesis en el hígado, como ácidos grasos, los cuales pueden ser oxidados para solventar las necesidades energéticas de otros tejidos (Kuriyama et al., 2002). La regulación de la vía lipolítica esta llevaba a cabo por la acción de varias hormonas. Por un lado, la disminución de los niveles de insulina durante el



ayuno provoca la supresión de la lipogénesis y la activación de la lipólisis. Por otro lado, los niveles elevados de glucagón circulante son los responsables de la activación de la vía de la proteína quinasa (PKA), dependiente de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y de la lipólisis en adipocitos. Finalmente, y de manera fundamental, las catecolaminas liberadas por el sistema nervioso simpático (SNS) durante el ayuno, mediante su unión a receptores  $\beta$  adrenérgicos, provocan la activación de la vía PKA y las vías lipolíticas (Carmen & Víctor, 2006). La hidrólisis de los TGs en diglicéridos (DGs) y posteriormente en monoglicéridos (MGs) es llevada a cabo por la acción conjunta de la lipasa de triglicéridos (ATGL) y la lipasa sensible a hormonas (HSL), respectivamente, en adipocitos (Haemmerle et al., 2002; Zimmermann et al., 2004). Para llevarlo a cabo, las proteínas asociadas a las gotas lipídicas, como la perilipina, son polifosforadas por la PKA, produciendo la translocación de HSL a las gotas lipídicas, como paso previo para la lipólisis (Brasaemle, 2007; Lafontan & Langin, 2009; Marcinkiewicz et al., 2006).

Actualmente se acepta que la movilización de ácidos grasos a otros tejidos a partir del tejido adiposo es una de las principales causas del desarrollo de resistencia a insulina, lo que ha llevado a proponer la inhibición de la lipólisis como una posible diana terapéutica (Guilherme et al., 2008). No obstante, la lipólisis está íntimamente relacionada con procesos potencialmente positivos en obesidad, como la termogénesis y el gasto energético, al constituir una fuente de ácidos grasos para la  $\beta$ -oxidación (Chondronikola et al., 2016; Haemmerle et al., 2006; Mottillo et al., 2012). Por otro lado, se ha observado que la inhibición de la lipogénesis por deficiencia de la sintasa de ácidos grasos (FAS), promueve el gasto energético y protege de la obesidad inducida por dieta, así como de la resistencia a insulina (Lodhi et al., 2012). Estos hallazgos sugieren que el equilibrio entre la lipogénesis y la lipólisis es fundamental para mantener la homeostasis energética sistémica y la sensibilidad a la insulina.

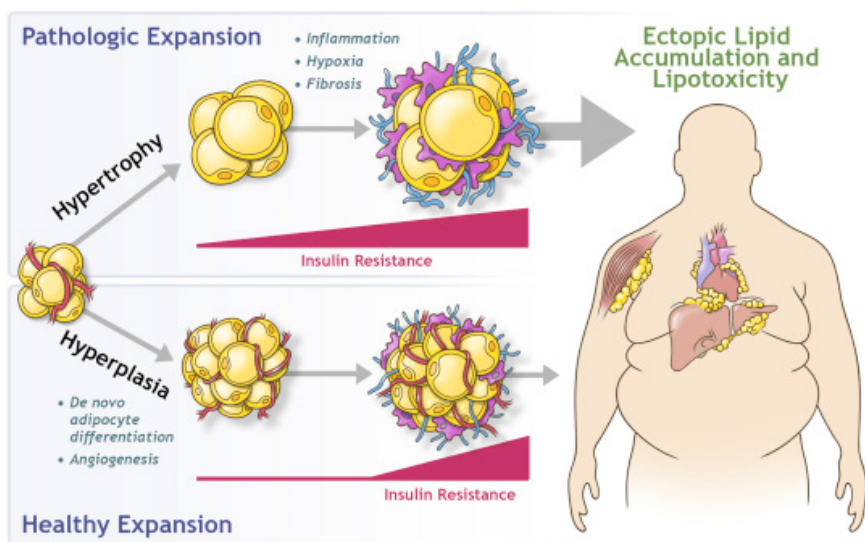


### 3. Alteraciones del tejido adiposo en obesidad

#### 3.1.- Expansibilidad del tejido adiposo.

La capacidad de expansión del tejido adiposo constituye un mecanismo de adaptación esencial del tejido y cuya misión principal es afrontar una ingesta calórica excesiva de manera crónica. Como se ha comentado previamente, la expansión del TA se caracteriza por la acumulación de lípidos en los adipocitos, los cuales pueden crecer en tamaño (hipertrofia) o en número (hiperplasia). La evidencia sugiere que tanto la capacidad de expansión como la forma de llevarla a cabo puede tener una alta incidencia sobre la salud de los individuos.

Concretamente, en obesidad se produce una expansión alterada del TA que conlleva la combinación de varios procesos patogénicos, incluida la presencia de adipocitos hipertróficos y disfuncionales así como una disminución de la hiperplasia y capacidad de diferenciación de los adipocitos lo que, junto al desarrollo de fibrosis, hipoxia e inflamación del tejido adiposo, se asocian al desarrollo de las alteraciones metabólicas ligadas a obesidad (Arner et al., 2010; Crewe et al., 2017; Datta et al., 2018; Kahn et al., 2019; Weyer et al., 2000). Estos procesos conducen a una limitación en la capacidad del tejido adiposo para almacenar lípidos lo que provoca la acumulación ectópica de estos lípidos en tejidos como el músculo esquelético o el hígado, provocando en estos resistencia a insulina, además de contribuir al daño del páncreas lo que, eventualmente, puede conducir al desarrollo de diabetes tipo 2 (Carobbio et al., 2017; Danforth, 2000; Slawik & Vidal-Puig, 2007; Virtue & Vidal-Puig, 2010). De esta forma, existe un consenso generalizado en la idea de que la incapacidad de almacenar el exceso de lípidos de forma adecuada puede contribuir a la disfunción metabólica durante la obesidad (Heilbronn et al., 2004).



**Figura 10. Expansión del tejido adiposo blanco (WAT) en obesidad.** La expansión del WAT en respuesta a un exceso de calorías puede llevarse a cabo mediante el agrandamiento de los adipocitos existentes (hipertrofia) y/o mediante un aumento del número de adipocitos (hiperplasia). La expansión patológica por medio de la hipertrofia de los adipocitos esta asociada a estados de inflamación, hipoxia y fibrosis junto al desarrollo de resistencia a insulina. La expansión sana del WAT se produce a través del reclutamiento de preadipocitos y la diferenciación de novo de los adipocitos, lo que previene o retrasa la aparición de la resistencia a insulina y la acumulación ectópica de lípidos. Tomado de Hepler et al. (2016)

Adicionalmente, se considera que la obesidad conlleva un cambio en el patrón de adipocinas secretadas por el tejido adiposo, modificando con ello las señales que llegan a otros órganos procedentes de dicho tejido, con el subsiguiente desbalance fisiológico en los órganos diana del tejido adiposo (Kahn et al., 2019; Scherer, 2019). Entre las señales alteradas procedentes del tejido adiposo obeso disfuncional, se encuentran las citoquinas pro-inflamatorias, como se desglosa en el apartado siguiente.

### 3.2.- Inflamación y tejido adiposo

Aunque las células del sistema inmune son críticas para el correcto funcionamiento del tejido adiposo en individuos sanos, la inflamación del tejido adiposo se considera un importante desencadenante de la disfunción metabólica asociada a obesidad (Crewe et al., 2017; DiSpirito & Mathis, 2015).

Concretamente, la hipertrofia de los adipocitos que ocurre en obesidad activa en éstos procesos de estrés celular (estrés oxidativo, del retículo endoplásmico) que confluyen en la activación de cascadas inflamatorias (JNK, NF- $\kappa$ B) y en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL6, etc.), quimiocinas (MCP-1, CCLs) y moléculas de adhesión

(VCAM, ICAM) por estas células, lo que promueve la infiltración del tejido adiposo por monocitos y otras células inmunes, como linfocitos B y linfocitos T, que exacerban la respuesta inflamatoria iniciada por los adipocitos (Boutens & Stienstra, 2016; Lackey & Olefsky, 2016; Malagón et al., 2013; A. Rodríguez et al., 2015; Sun et al., 2013; Zmora et al., 2017). De hecho, existe una alta correlación entre el tamaño de los adipocitos y la muerte de los mismos por apoptosis cuando la capacidad de expansión del tejido adiposo ha alcanzado su límite (Strissel et al., 2007). En particular, la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo obeso contribuye de manera fundamental al estado inflamatorio asociado a obesidad (Weisberg et al., 2003). Así, los monocitos reclutados (o los originados por proliferación local, especialmente al inicio de la obesidad (Zheng et al., 2016) polarizan hacia un fenotipo M1 proinflamatorio (*classically activated macrophages*, productores de citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-12) (Lackey & Olefsky, 2016). Esto ocurriría en detrimento de los macrófagos residentes del tejido (procedentes de médula ósea), que se considera que son predominantemente de tipo M2 anti-inflamatorios (*alternatively activated macrophages*, productores de citoquinas anti-inflamatorias como IL-4 o IL-10) y contribuyen a mantener la homeostasis normal del tejido (Boutens & Stienstra, 2016). De esta forma, durante la obesidad, la producción de citoquinas se vuelve crónica, provocando tanto una alteración de la señalización de insulina en adipocitos como un aumento de la inflamación, lo que desemboca en un agravamiento de la disfunción del tejido adiposo y en el establecimiento del estado de inflamación sistémica de bajo grado que acompaña a la obesidad (Cinti et al., 2005; Crewe et al., 2017; Lumeng et al., 2007).

En relación con la inflamación, dada la participación de los macrófagos en la remodelación de la matriz extracelular, en obesidad también se produce, como se ha indicado anteriormente, un fenómeno de fibrosis, que se considera como uno de los procesos patogénicos más relevantes que vinculan el exceso de grasa con el desarrollo de enfermedades metabólicas (Crewe et al., 2017; Datta et al., 2018; Sun et al., 2013). Estudios del laboratorio y de otros autores indican que la obesidad se acompaña de un acúmulo de colágenos fibrosos, como colágeno I, que se organiza tanto en haces gruesos en la fracción de estroma vascular, como alrededor de los adipocitos (fibrosis pericelular), además de con cambios en la organización de las fibras motivados por

modificaciones en otros componentes de la matriz extracelular, como proteoglicanos, que alteran las propiedades elásticas de la matriz y contribuyen a la disfunción de los adipocitos (Divoux & Clément, 2011; Guzmán-Ruiz et al., 2020; V. Pellegrinelli et al., 2016).

### 3.3.- Heterogeneidad metabólica de los individuos obesos

Actualmente se acepta que no todos los individuos obesos, aunque con IMCs comparables, presenten complicaciones metabólicas, o de la misma gravedad. De hecho, algunos autores definen el término de “obesos como metabólicamente sanos” (*metabolically healthy obese*, MHO), en contraposición a los “obesos con complicaciones metabólicas” (*metabolically unhealthy obese*, MUHO), aunque existe una cierta controversia sobre el hecho de que pueda existir una obesidad “saludable” (Blüher, 2014; Phillips, 2016). Más allá de las diferencias en definición, se conoce que existen individuos obesos que presentan una baja incidencia de hipertensión, un perfil de lípidos y niveles de glucosa en ayuno en rangos saludables, así como una sensibilidad adecuada a la insulina (Primeau et al., 2011), a diferencia de los obesos MUHO, que desarrollan importantes alteraciones metabólicas (Iacobini et al., 2019).

Por otra parte, se ha demostrado que una peor salud metabólica se asocia con adipocitos más grandes que en sus homólogos MHO (Klöting et al., 2010; O'Connell et al., 2010), así como con una mayor acumulación de grasa visceral, lo que se ha propuesto como factores determinantes del fenotipo metabólico no saludable de estos sujetos (Brochu et al., 2001; Messier et al., 2010; Primeau et al., 2011). También se ha observado que la acumulación ectópica de lípidos, tanto en hígado como en músculo esquelético, es un rasgo diferenciador entre individuos MHO y MUHO, siendo menor en los primeros (Ogorodnikova et al., 2013; Primeau et al., 2011; Stefan et al., 2008).

Algunos investigadores han propuesto la secreción diferencial de adipoquinas pro-inflamatorias como un mecanismo subyacente del fenotipo MHO (Koster et al., 2010; Phillips & Perry, 2013; Shin et al., 2006). De hecho, se ha observado que una menor infiltración del tejido adiposo por macrófagos en individuos MHO (Blüher, 2010; van

Beek et al., 2014). En consonancia, se ha descrito que los genes que codifican algunas citoquinas pro-inflamatorias se expresan en mayor medida en el tejido adiposo de sujetos MUHO en comparación con los individuos MHO (Hardy et al., 2011; Xu et al., 2012). Finalmente, gracias a los resultados obtenidos a través de estudios longitudinales, se ha observado que los fenotipos no perduran por largos periodos de tiempo, de manera que el 30% de los individuos con MHO progresa a MUHO en un periodo de tiempo comprendido entre 5 y 10 años (Appleton et al., 2013; Chang et al., 2012; Soriguer et al., 2013).

En definitiva, la obesidad puede definirse como una patología compleja, tanto en los múltiples mecanismos patogénicos que subyacen en la disfunción del tejido adiposo (hipertrofia celular, inflamación, fibrosis, hipoxia...), como en la repercusión metabólica que tiene en los diferentes individuos (MHO vs. MUHO). La identificación de marcadores de daño del tejido y su asociación al desarrollo de enfermedades metabólicas asociadas a obesidad aparece como un factor crítico para profundizar en el conocimiento de esta patología y punto de partida para el posible desarrollo futuro de estrategias para el diagnóstico y tratamiento de dichas comorbilidades. En este contexto, las tecnologías “ómicas” pueden contribuir a alcanzar estos objetivos.

#### 4. El lipidoma y rutas metabólicas de biosíntesis de lípidos.

El lipidoma constituye la parte del metaboloma que incluye todas las biomoléculas definidas como lípidos (Kenwood & Merrill, 2016). Se trata de una familia de compuestos diversos desde un punto de vista estructural que, atendiendo a los criterios del consorcio LIPID MAPS (NIH), incluye ocho categorías de lípidos: ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esterolípidos, prenolípidos, sacarolípidos y policétidos, todos ellos derivados de acetil-CoA (Fahy et al., 2009).

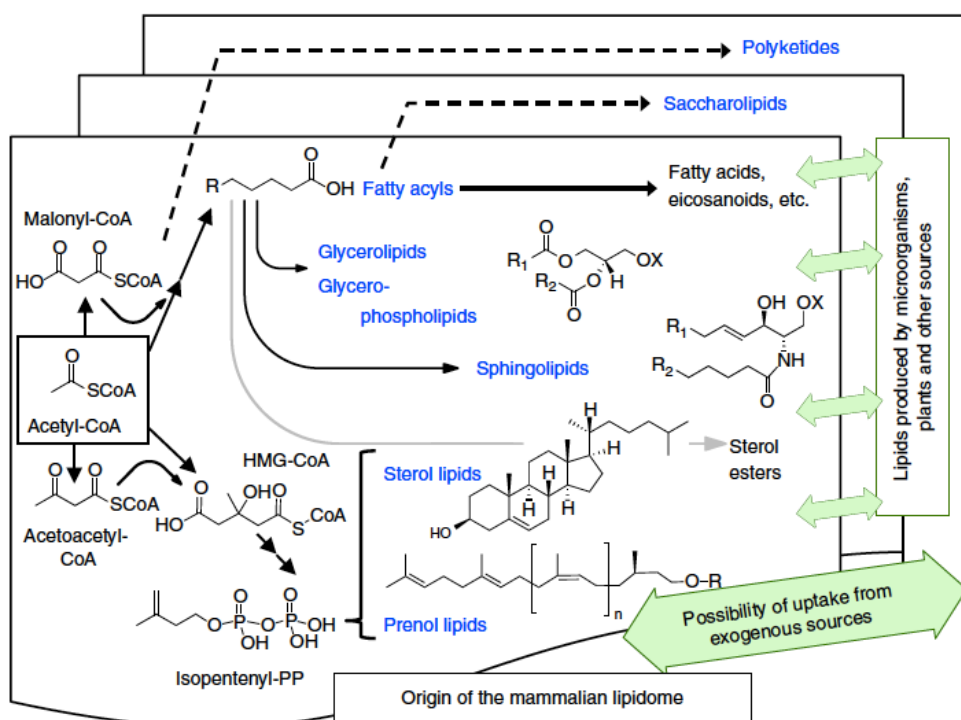


Figura 11. Representación esquemática de las categorías de lípidos y la interrelación de sus rutas metabólicas. Adaptado de LIPIDMAPS (<http://www.lipidmaps.org>)

Según algunos autores, la lipidómica se define como “la caracterización completa de especies moleculares de lípidos y de sus funciones biológicas con respecto a la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo y función de los lípidos, incluida su regulación génica” (Spener et al., 2003). Aunque se ha avanzado mucho desde los primeros estudios lipidómicos (Han & Gross, 2003; Kishimoto et al., 2001) se acepta que aún existen limitaciones técnicas que impiden conocer el lipidoma celular completo, que se estima que puede incluir en torno a 200.000 especies lipídicas distintas (Fahy et al., 2011; Kenwood & Merrill, 2016).

Los lípidos son esenciales en el mantenimiento de las funciones celulares, por su participación en procesos tan relevantes como el control del ciclo celular o la señalización celular y, en consecuencia, en la homeostasis de tejidos y órganos y del organismo completo (Santos & Preta, 2018). De hecho, está ampliamente aceptado el papel de los lípidos en muchas enfermedades metabólicas como obesidad, aterosclerosis, accidentes cerebrovasculares, hipertensión y diabetes (Fahy et al., 2011).

Los recientes avances en el campo de la lipidómica han permitido ampliar de manera notable nuestra comprensión del alcance y complejidad de la desregulación de lípidos en la obesidad y las enfermedades metabólicas (Han, 2016). Aunque los primeros estudios fueron limitados en cuanto al tamaño y cobertura del lipidoma identificado, estudios poblacionales más recientes usando muestras de suero o plasma, han revelado roles potenciales para una amplia variedad de especies de lípidos en el desarrollo y evolución de la enfermedad metabólica (Meikle & Summers, 2017). Por ejemplo, en estudios lipidómicos realizados sobre muestras de gemelos monocigóticos y discordantes en cuanto a obesidad, se observó un aumento de los niveles plasmáticos de fosfatidilcolinas, así como un descenso en los niveles de éter-fosfolípidos, incluidos los plasmalógenos, en el grupo de gemelos obesos comparado con el de gemelos no obesos (K. H. Pietiläinen et al., 2007). Por otra parte, otro estudio poblacional con 1076 estadounidenses de ascendencia mexicana reveló que los niveles de 200 de las 312 especies lipídicas detectadas en plasma se correlacionaban de manera directa con el IMC, por delante de parámetros clásicos como la edad, el sexo, la presión sistólica o el tabaquismo, entre otros (Weir et al., 2013). Concretamente, se observó una fuerte correlación negativa entre los niveles de lisofosfatidilcolinas y muchas especies de éter-fosfolípidos con respecto al IMC y, en menor medida, también con lisofosfatidiletanolaminas y algunas clases de glucoesfingolípidos.

Por el contrario, los niveles de ésteres de TG, DG y colesterol se asociaron positivamente con la obesidad, al igual que la fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y algunas clases de esfingolípidos, como la esfingomielina y la dihidroceramida. Finalmente, en un estudio lipidómico sobre diabetes tipo 2 en una cohorte de obesos de Australia, se observó una correlación positiva de los niveles de ceramida plasmáticos

con respecto al IMC mientras que los niveles de algunas especies de esfingomielinas y glucoesfingolípidos se asociaban de manera negativa (Mousa et al., 2019). Estos resultados sugieren que a medida que avanza la enfermedad metabólica, se produce un desequilibrio en el metabolismo de esfingolípidos, lo que conduce a una mayor producción y/o acumulación de ceramidas (Mousa et al., 2019).

A nivel de tejido adiposo, los estudios lipidómicos son más limitados, debido, en parte, a las dificultades técnicas que impone la propia naturaleza del tejido, especialmente en condiciones de obesidad. No obstante, ya se ha establecido el lipidoma comparativo del tejido adiposo subcutáneo vs. visceral de individuos con sobrepeso, definiéndose una mayor acumulación de fosfatidilcolinas, triacilgliceroles y diacilgliceroles, aunque concentraciones más bajas de ceramida, en el tejido subcutáneo, mientras que el grado de insaturación en los fosfolípidos es menor del tejido adiposo visceral, sugiriendo una menor incorporación de ácidos grasos insaturados en dicho depósito (Zacharia et al., 2020). Notablemente, los cambios inducidos en respuesta a obesidad pueden diferir de acuerdo al sexo, como muestran estudios recientes en ratones ob/ob, demostrando un mayor contenido de ácidos grasos con cadenas más largas (González-Granillo et al., 2019). Otros estudios recientes en ratones con obesidad genética o inducida por dieta demostraron cambios tanto en los lípidos que se acumulan en el núcleo neutro de las gotas lipídicas de los adipocitos (diglicéridos, TG) como en los componentes lipídicos de las membranas celulares (fosfatidilcolinas, lisofosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y fosfatidilserinas), incluida la monocapa de fosfolípidos que rodea a las gotas lipídicas (Liu et al., 2020). En conjunto, estos resultados apoyan la idea que la expansión de los adipocitos que ocurre en obesidad afecta profundamente al remodelado de la membrana de estas células, además de afectar, presumiblemente, a la composición lipídica de los otros tipos celulares que componen este tejido.

En humanos, se han establecido ya los perfiles de TGs del tejido adiposo, subcutáneo y visceral, de individuos obesos con o sin resistencia a insulina o con diabetes tipo 2, demostrando la existencia de diferencias significativas en la firma de TGs dependiendo del estado metabólico (i.e., C46:4, C48:5, C48:4, C38:1, C50:3, C40:2, C56:3, C56:4, C56:7 y C58:7) o de depósito graso (más C53:5, C51:3, C50:4, C59:1, C54:6 y C50:2 en tejido



adiposo visceral y más C38:1 tejido adiposo subcutáneo) que pueden contribuir al avance de la enfermedad metabólica (Al-Sulaiti et al., 2018). Otros estudios han mostrado la existencia de diferencias en el enriquecimiento selectivo de depósito graso en ciertos esfingolípidos y glicerolípidos (Jové et al., 2014). Los mecanismos fisiológicos que conducen a las alteraciones en la homeostasis lipídica en obesidad son complejos ya que involucran a un elevado número de especies lipídicas y sus rutas metabólicas de biosíntesis están interconectadas (Meikle & Summers, 2017). No obstante, se ha propuesto un papel para muchos esfingolípidos y éter-fosfolípidos como componentes críticos en el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina o diabetes tipo 2 (Meikle & Summers, 2017). Por ello, el conocimiento de los mecanismos que regulan la biosíntesis de estas formas lipídicas podría servir para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas en obesidad y enfermedad metabólica.

### 3.1.- Metabolismo de Esfingolípidos

Los esfingolípidos son lípidos de carácter anfipático que se derivan del aminoalcohol insaturado esfingosina o dihidroesfingosina. Estos lípidos son importantes componentes estructurales de la membrana plasmática y participan en procesos de señalización. Están compuestos por una cabeza polar y dos colas no polares sujetas a la esfingosina como base central, y a la que se unen los ácidos grasos por medio de enlaces amida. La clasificación actual divide a los esfingolípidos en dos grandes grupos: esfingomielinas (SMs) y glucoesfingolípidos (GELs), compuestos de glucoesfingolípidos y galactoesfingolípidos (C. R. Gault et al., 2010). Recientemente, se ha descrito que estas moléculas pueden estar implicadas en el desarrollo de resistencia a insulina y/ síndrome metabólico (Cowart, 2009). Las ceramidas constituyen el eje central del metabolismo de esfingolípidos y son sintetizadas principalmente en la cara citosólica del retículo endoplasmático (RE). Para llevar a cabo su síntesis *de novo*, se requiere la participación de las enzimas Serina C-palmitoiltransferasa (SPT1), dihidroceramida desaturasa (DEGS) y ceramida sintasa (CerS) (Blom et al., 2011; C. R. Gault et al., 2010). Una vez sintetizadas en el RE, las ceramidas son transportadas hacia el aparato de Golgi, y posteriormente traslocadas a la membrana plasmática bien a través de transporte vesicular o bien por medio de la proteína de transporte de ceramidas (CerT), dada su baja solubilidad. Finalmente, las ceramidas pueden ser convertidas en SM o GELs gracias a la

participación de la esfingomielina sintasa (SMS1 y 2) o glucoesfingolípido sintasa (GCS), respectivamente (Blom et al., 2011; C. R. Gault et al., 2010).

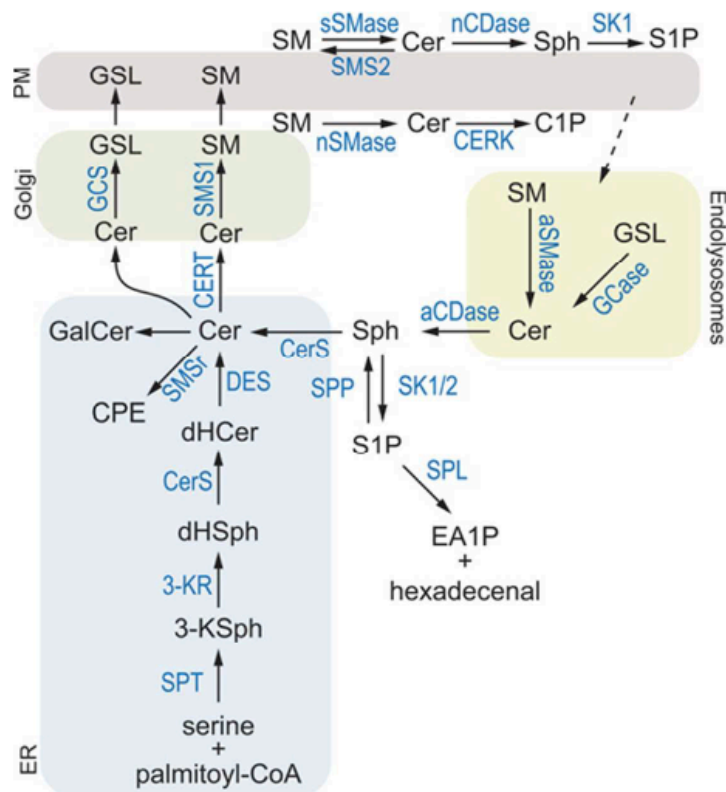


Figura 12. Esquema representativo de la síntesis de esfingolípidos. Tomado de Mullen *et al.* (2012)

Los esfingolípidos están enriquecidos en las balsas lipídicas presentes en la membrana plasmática (también descritas en las membranas del aparato de Golgi y lisosomas) (Lingwood & Simons, 2010), de tal manera que los cambios en su mecanismo de biosíntesis pueden conducir a una alteración de la composición y función de dichas membranas, lo que afectaría de manera directa tanto al tráfico de lípidos como al metabolismo del colesterol, que también es un componente principal de estos dominios de membrana (Róg & Vattulainen, 2014). Por otra parte, se ha descrito que una desregulación del contenido de esfingolípidos podría afectar a la comunicación celular y la adhesión entre células (D'Angelo et al., 2013; Hakomori & Igarashi, 1995). A nivel patológico, se ha observado que un aumento de los niveles de ceramidas conlleva un aumento de la lipotoxicidad y una mayor probabilidad de sufrir trastornos metabólicos como la resistencia a la insulina (Chaurasia & Summers, 2015; Summers, 2006; Zhang et al., 2013).

### 3.2.- Metabolismo de Éter-fosfolípidos

Los éter-fosfolípidos constituyen una subclase importante de glicerofosfolípidos que se caracteriza por la presencia de un enlace éter en la posición sn-1 y un enriquecimiento de ácidos grasos de tipo poliinsaturados en la posición sn-2 (Meikle & Summers, 2017). Dentro del grupo de éter-fosfolípidos, destacan los plasmalógenos, los cuales son producidos en los peroxisomas y madurados en el retículo endoplasmático (Wallner & Schmitz, 2011). Estas especies lipídicas son la forma más abundante de éter-fosfolípidos y se ha descrito su implicación en el desarrollo de muchas patologías asociadas a defectos en su biosíntesis (Wanders et al., 2010).

La biosíntesis de los plasmalógenos comienza en los peroxisomas, y el sustrato inicial puede proceder o bien de la reducción de los ácidos grasos a alcoholes grasos por parte de la *Fatty Acyl-CoA Reductase 1* (FAR1) o bien a partir de la acilación de dihidroacetona-fosfato por parte de la enzima *glyceronephosphate O-acyltransferase* (GNPAT). A continuación, el 1- acyl-dihydroxyacetonephosphate (acyl-DHAP) es reducido a alquil-DHAP por parte de la enzima *Alkylglycerone Phosphate Synthase* (AGPS). Finalmente, el precursor 1-alquil-DHAP es transportado a la membrana del RE, donde se transforma en 1-alquil-G3P gracias a la actividad de la enzima *Acyl/alkyl-dihydroxyacetone phosphate reductase* (AADHAP-R), localizada en la membrana de los peroxisomas y del RE (N. E. Braverman & A. B. Moser, 2012).

Las siguientes etapas del proceso de biosíntesis de plasmalógenos se llevan a cabo en el RE y comienzan con la formación de 1-alquil-2-acil-sn-glicero-3-fosfato por parte de la enzima *acyl/alkyl-G3P-acyltransferase* (AAG3P-AT). Posteriormente, las siguientes fases conducirán a la formación de 1-alquil-2-acilo-G3P seguido de la síntesis de 1-alquil-2-acil- glicerol, los cuales serán acoplados con grupos de cabeza específicos por parte de acción combinada de fosfotransferasas (N. E. Braverman & A. B. Moser, 2012; Wallner & Schmitz, 2011).

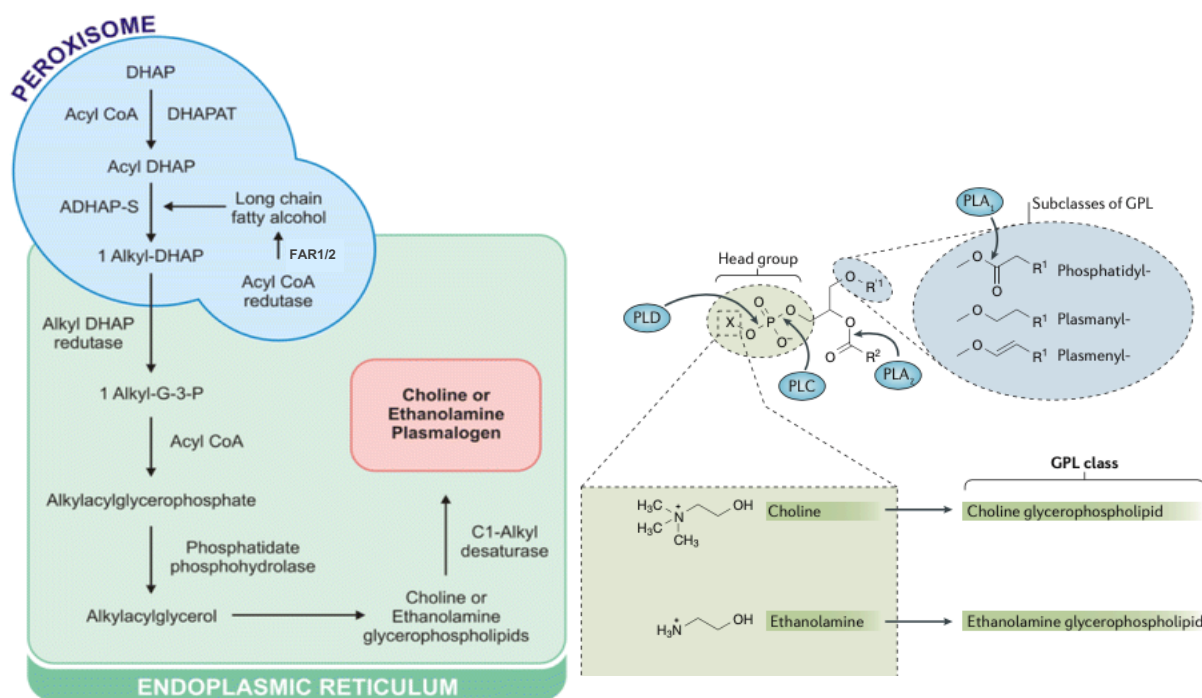


Figura 13. Metabolismo de éter-fosfolípidos. A) Representación esquemática de la biosíntesis de éter-fosfolípidos B) Estructura y subclases de éter-fosfolípidos. Tomado de Fernandes *et al.* (2018) y Han *et al.* (2016).

Los plasmalógenos intervienen en una multitud de procesos biológicos que abarcan desde la fluidez de las membranas y la protección frente al estrés oxidativo hasta la transducción de señales, entre otras (N. E. Braverman & A. B. Moser, 2012). Por un lado, se ha descrito en estudios lipidómicos previos que los plasmalógenos se correlacionan de manera negativa con la obesidad (K. H. Pietiläinen *et al.*, 2007), siendo característicos de un mayor estado de estrés oxidativo (Brites *et al.*, 2004; Wallner & Schmitz, 2011). De hecho, el enlace vinil-éter de los plasmalógenos los hace particularmente susceptibles a la oxidación por parte de las especies reactivas de oxígeno, lo que sugiere un potencial efecto antioxidante y protector en el organismo. En consonancia, recientemente se ha descrito que el enriquecimiento de lipoproteínas con plasmalógenos aumenta su resistencia a la oxidación (Meikle & Summers, 2017).

Por otra parte, se ha descrito que los plasmalógenos de etanolamina (PE) impiden la oxidación del colesterol en las bicapas lipídicas, de manera que actúan regulando tanto la esterificación de ácidos grasos como el flujo de colesterol en la membrana plasmática (Mankidy *et al.*, 2010). Asimismo, se ha observado una correlación inversa entre los niveles de plasmalógenos y la edad (N. E. Braverman & A. B. Moser, 2012; Su *et al.*,

2019). También se ha descrito una asociación positiva de los plasmalógenos con respecto a los niveles séricos de HDL y negativa con respecto a los niveles de LDL (Hahnel et al., 1999; Orsoni et al., 2016).

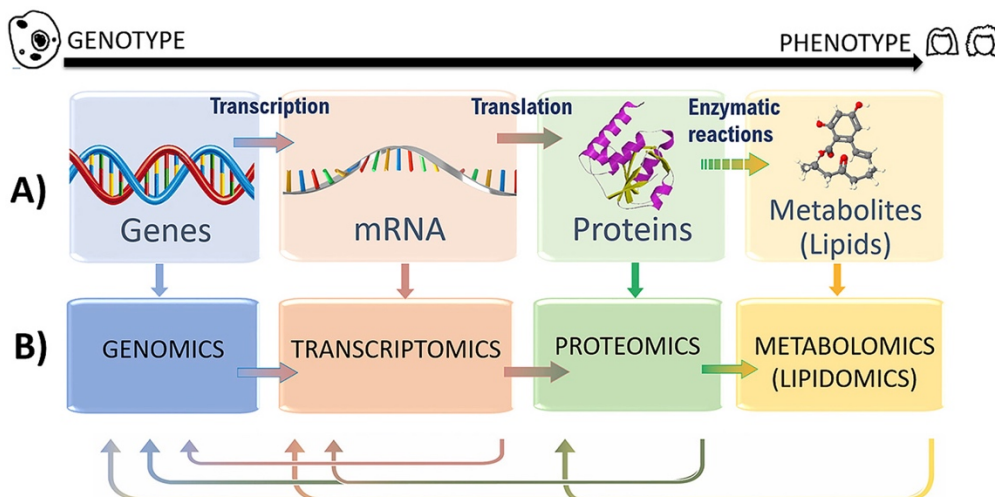
#### 5. Aplicaciones lipidómicas para el estudio de la obesidad.

Tras el auge y desarrollo de la genómica y la proteómica, la metabolómica surgió como un nuevo campo de investigación que ha ido avanzando a pasos agigantados en la búsqueda de factores predictivos del desarrollo de enfermedades. Como se ha indicado anteriormente, dentro de esta disciplina se encuentra la lipidómica, una herramienta para el estudio y caracterización del conjunto de lípidos celulares, incluyendo su interacción con otras moléculas, así como sus funciones en el organismo (Han, 2016). Los avances adquiridos en técnicas analíticas de separación de biomoléculas, así como su combinación con la espectrometría de masas, ha permitido detectar una gran variedad de especies lipídicas de manera rápida, sensible y fiable, usando una cantidad de muestra mínima (S. J. Blanksby & T. W. Mitchell, 2010; Han et al., 2012).

El lipidoma o perfil lipídico de una muestra biológica se compone a partir de un espectro de masas que indica la composición y abundancia de cada uno de los lípidos contenidos en ella. El uso de esta herramienta analítica permite monitorizar cambios temporales en respuesta a un determinado estímulo o al inicio y evolución de una enfermedad (Han, 2016; Züllig et al., 2020). En consecuencia, se ha producido un cambio en la mentalidad de estudio sobre los lípidos de los tejidos, pasando desde una perspectiva general a una más específica donde no sólo se analizan las clases lipídicas sino también las especies moleculares a nivel individual. Dado que las rutas metabólicas de los lípidos se han estudiado previamente en profundidad, cualquier variación en la composición de estos lípidos puede revelar información esencial sobre las enzimas y genes que participan en cada proceso y que podría haber sido comprometidas.

El análisis del perfil lipídico por estrategias basadas en espectrometría de masas ha permitido llevar a cabo la identificación de isómeros posicionales de ácidos grasos, así como más de 40 clases de lípidos y miles de especies lipídicas a nivel individual (Han & Gross, 2005; Han et al., 2012; Wang et al., 2016; K. Yang et al., 2009). Por otra parte, la

técnica de cromatografía líquida también se ha empleado con éxito en el análisis exhaustivo tanto de las clases lipídicas como de sus especies moleculares (Cajka & Fiehn, 2014; Köfeler et al., 2012; Quehenberger et al., 2010).



**Figura 14. Dogma central de la biología molecular.** A) Representación de los mecanismos de transmisión y expresión de la herencia genética para producir las proteínas y metabolitos producidos por el organismo. B) Esquema general sobre las disciplinas de estudio que componen las ciencias ómicas. Tomado de Luque de Castro *et al.* (2020).

### 5.1.- Cromatografía líquida de alta resolución (LC-MS).

Los análisis lipidómicos basados en cromatografía líquida (LC) generalmente comienzan con la extracción de los lípidos contenidos en la muestra biológica, seguida de su separación por LC en fase reversa (RPLC) o normal (NPLC). Una vez separadas cromatográficamente, las moléculas entran en la fuente de ionización donde adquieren la carga necesaria para ser detectadas por un analizador de masas. Este procedimiento puede llevarse a cabo de manera dirigida (monitorizando reacciones múltiples), específica de clases (escaneando los iones del producto o sus precursores) o no dirigida (adquiriendo los espectros al completo) (Cajka & Fiehn, 2014; Navas-Iglesias et al., 2009).

En general, las aplicaciones de la lipidómica requieren estrategias analíticas que sean capaces de extraer una amplia gama de analitos con diferentes polaridades y que, al mismo tiempo, sean rápidos, reproducibles y compatibles con la técnica instrumental

(Godzien et al., 2013; Whiley et al., 2012). Al mismo tiempo, las muestras suelen ser limitadas en cantidad, lo que supone un reto a nivel técnico puesto que se requieren procedimientos experimentales que ahorren muestras.

Con el objetivo de mejorar la cobertura de detección de lípidos, se han desarrollado múltiples estrategias para la extracción de los lípidos contenidos en la muestra. Por una parte, la mayoría de los estudios lipidómicos se ha llevado a cabo siguiendo la metodología propuesta Folch *et al.* (Folch et al., 1957) y Bligh-Dyer (Bligh & Dyer, 1959) o variantes de la misma. El método de Folch emplea una mezcla de cloroformo /metanol (2:1, v/v) para la extracción mientras que el método de Bligh-Dyer también utiliza la misma mezcla, pero en distinta proporción para cada componente (1:2, v/v) y a la que posteriormente le añade una solución de cloroformo/agua (1:1, v/v). Por otra parte, Matyash *et al.* (Matyash et al., 2008) introdujeron en 2008 un nuevo método para la extracción de muestras, que incluye el uso de metil tert-butil éter (MTBE) y cuya ventaja principal es que reduce la densidad de la fase orgánica, minimizando las pérdidas por goteo. Por último, los métodos de extracción en fase sólida (SPE) se han utilizado para el análisis del perfil lipídico y están recomendados en aquellos experimentos donde fracciones específicas de lípidos interfieren sobre el total de clases lipídicas, provocando un efecto pantalla (Ruiz-Gutiérrez & Pérez-Camino, 2000).

Por otra parte, la separación por LC de las moléculas detectadas reduce sustancialmente algunas de las limitaciones asociadas al análisis por espectrometría de masas, como pueden ser la detección de isobaras e isómeros o los efectos de supresión iónica causados por las moléculas que compiten por la ionización (Stephen J. Blanksby & Todd W. Mitchell, 2010). Además, el uso de LC proporciona la posibilidad de separar o concentrar diferentes clases de compuestos de acuerdo a sus propiedades físico-químicas. Generalmente, se emplean tres tipos de configuración del LC para el análisis de mezclas complejas de lípidos: RPLC, NPLC e HILIC. RPLC se basa en la lipofilidad, que se rige por la longitud de la cadena de carbono y el número de dobles enlaces.

Por otra parte, NPLC y HILIC distinguen las especies de lípidos conforme a sus propiedades hidrófilas, de manera que separan de acuerdo a las cabezas polares representativas de cada grupo (Sandra & Sandra, 2013).

Finalmente, la elección del modo de ionización utilizado en el análisis LC-MS tiene un impacto importante en el perfil de lipidomas que se puede obtener. Aunque una única metodología no puede cubrir todos los tipos de moléculas, estrategias tales como el uso de aditivos disueltos en las fases móviles pueden incrementar la eficiencia de ionización (Hummel et al., 2011). Si bien la electropulverización (ESI) en modo positivo es el método de ionización más común para una amplia gama de lípidos, se obtienen mejores resultados con la ionización en modo negativo respecto a la identificación de determinadas clases de lípidos como fosfatidilinositol, fosfatidilserina o ácido fosfatídico (Seppänen-Laakso & Orešič, 2009). Por otra parte, la ionización química a presión atmosférica (APCI) está recomendada para el análisis de lípidos no polares como, por ejemplo, los triglicéridos, aunque se utiliza menos frecuentemente en estudios lipidómicos.

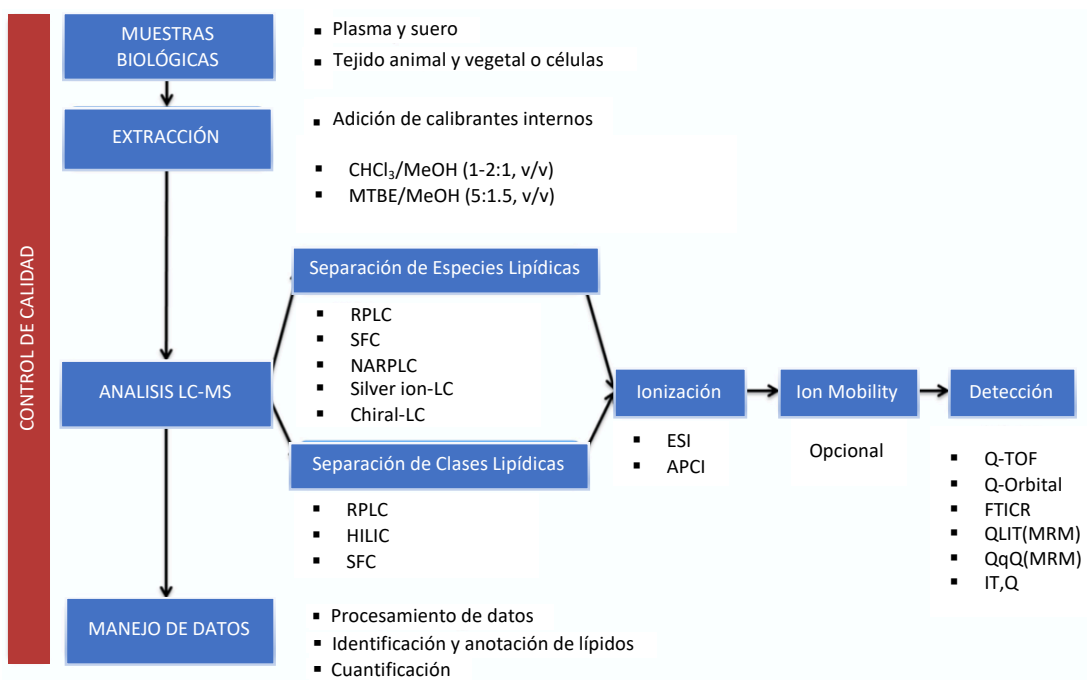


Figura 15. Esquema global sobre las etapas principales y los componentes de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Adaptado de Cajka *et al.* (2014).



## 5.2.- MALDI-Imaging.

La obtención de imágenes por espectrometría de masas (IMS) representa una poderosa herramienta analítica utilizada tanto en el mapeo de bioanalitos en tejidos (Korte et al., 2015; Lee et al., 2012; Stoeckli et al., 2001), como en el desarrollo de fármacos (Cobice et al., 2015; Nilsson et al., 2015). A pesar de su potencial en el descubrimiento de nuevos biomarcadores y su implementación en el campo de la histopatología (Longuespée et al., 2016; Schwamborn et al., 2017), su aplicación en ciencias naturales y de la salud es relativamente nueva (Budzikiewicz & Grigsby, 2006). Una de las principales ventajas de esta técnica es que permite identificar cientos de biomoléculas en un solo experimento sin necesidad de recurrir a marcajes específicos (Buchberger et al., 2018). De esta manera, permite la visualización bidimensional de la distribución de las biomoléculas presentes en el tejido sin necesidad de recurrir a técnicas de extracción, purificación o separación de analitos (Passarelli & Ewing, 2013). La técnica de MALDI-IMS (*Matrix-assisted laser desorption ionization- Imaging Mass Spectrometry*) constituye una de las técnicas más utilizadas para la obtención de imágenes a una resolución subcelular, lo cual es importante para dilucidar las funciones biológicas potenciales de los analitos en estudio (Ščupáková et al., 2020).

El procedimiento general de la técnica comienza con la deposición de una sección representativa de la muestra biológica bien en un soporte de acero o bien en un portaobjetos de vidrio, normalmente recubierto con ITO (*Indium tin oxide*) para conferirle propiedades eléctricas. A continuación, se recubre la muestra con una sustancia orgánica (matriz de ionización), la cual absorbe la energía generada durante el pulso de un láser (generalmente UV, 335-350nm) y la usa para provocar la desorción e ionización de la muestra de interés. Como resultado, los iones generados son captados por un analizador de masas en el tubo de vuelo y posteriormente clasificados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). De este modo, la adquisición de espectros se lleva a cabo a lo largo del eje X e Y del soporte, permitiendo conocer tanto la concentración como la localización de cada analito de interés en toda la sección del tejido analizado.

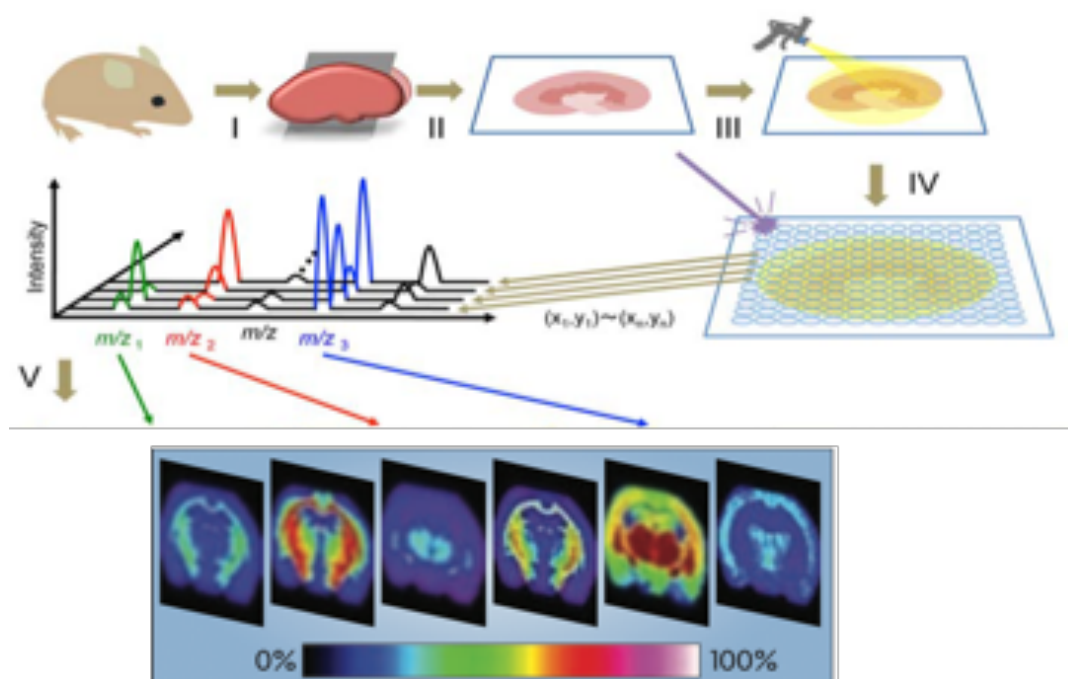


Figura 16. Esquema representativo de las etapas necesarias para llevar a cabo la técnica de MALDI-IMS en muestras biológicas. I) Sacrificio y disección de órganos, II) Obtención de criocortes, III) Deposición de la matriz, IV) Escaneado 2D de la muestra a través del MALDI, V) Elaboración de imágenes a partir de iones  $m/z$  detectados en cada espectro. Adaptado de Schwamborn *et al.* (2010) y Fujimura *et al.* (2014).

Asimismo, el tamaño del pixel en un experimento de MALDI estará determinado por la distancia a la que se mueve la muestra entre dos mediciones y generalmente se elige en el mismo rango que el diámetro del enfoque del láser para evitar la superposición del área analizada (Spengler, 2015). Normalmente, la mayoría de los estudios de MALDI-IMS se han llevado a cabo usando una resolución espacial comprendida entre 50 y 200  $\mu\text{m}$  por cada pixel (Spengler, 2015). Sin embargo, la implementación de nuevos avances en los equipamientos de MALDI ha permitido obtener imágenes de MALDI con una resolución de entre 2,5 y 5  $\mu\text{m}$  (Feenstra *et al.*, 2017; Römpf & Spengler, 2013).

Por otra parte, los protocolos de preparación de la muestra, así como la constitución de la misma, varían sensiblemente entre cada estudio y representan una fuente de variaciones ilimitada que dificulta el rendimiento del análisis (Wiangnon & Cramer, 2015). Así, en esta etapa pueden influir desde parámetros como la humedad relativa, la temperatura, el flujo de aire o la superficie de soporte de la muestra hasta la co-cristalización de la matriz con el analito (Wiangnon & Cramer, 2015). En consecuencia, los procesos de desorción y formación de iones resultantes se verán afectados, lo que a

su vez tendrá incidencia sobre el número de iones detectados durante el análisis. Por lo tanto, aunque todas las etapas del proceso de preparación de la muestra son igualmente importantes, la aplicación de la matriz es crítica y debe ser optimizada para cada estudio de manera empírica. La investigación de nuevas matrices de ionización es un campo en continuo desarrollo y esta basada en la optimización de parámetros como la absorción láser o su estabilidad al vacío (Leopold et al., 2018b). Por otra parte, se han estudiado tanto superficies (Dufresne et al., 2016; Endres et al., 2018; Wang et al., 2017; Yang & Caprioli, 2014; Zavalin et al., 2012) como nuevos métodos de deposición de la matriz (Huizing et al., 2019) con el objetivo de mejorar tanto la sensibilidad de la técnica como la identificación de analitos de interés. También se ha descrito en estudios recientes que la deposición de la matriz puede afectar tanto a la deslocalización generalizada de analitos en la muestra (Huizing et al., 2019) como al tamaño de los cristales de la matriz depositada (Van Nuffel et al., 2018).

En este contexto, la mayoría de los estudios clínicos llevados a cabo mediante MALDI-IMS se han dedicado al análisis de proteínas o péptidos en muestras procedentes de modelos animales o directamente muestras humanas (Cornett et al., 2007). Sin embargo, durante la última década se ha producido un aumento considerable en el número de publicaciones relacionadas con el estudio de lípidos y su correlación con ciertas enfermedades (Meikle & Summers, 2017; Turpin-Nolan & Brüning, 2020; Zhao et al., 2015). Por una parte, se ha descrito recientemente una redistribución espacial del perfil lipídico en muestras de hígado procedentes de modelos animales de enfermedad hepática de hígado graso no alcohólico (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH) respecto al hígado sano (Hall et al., 2017). También, se detectaron cambios globales en la proporción de fosfolípidos en el cerebro de un modelo de ratón que mimetiza las condiciones presentes durante el desarrollo de Alzheimer (Hong et al., 2016). Por tanto, la identificación y cuantificación de lípidos en muestras biológicas es un tema de interés en el ámbito de la investigación biomédica (Rustam & Reid, 2018) en general y de manera más particular, en el campo de la obesidad así como en las patologías asociadas (Hammarstedt et al., 2018).



OBJETIVOS



El objetivo principal de la presente Tesis doctoral ha sido identificar los cambios, cuantitativos y cualitativos, que afectan al lipidoma del tejido adiposo en condiciones de obesidad y resistencia a la insulina, así como las posibles alteraciones que ocurren en las rutas de biosíntesis de los lípidos modificados en dichas condiciones. Para lograr este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- I. Optimización y desarrollo de un protocolo para el procesamiento de muestras de tejido adiposo mediante MALDI-Imaging Mass Spectrometry (MALDI-IMS).**
- II. Caracterización del perfil y distribución espacial del lipidoma del tejido adiposo subcutáneo mediante MALDI-IMS en modelos (murino y humano) de obesidad y resistencia a insulina y/o diabetes tipo 2.**
- III. Análisis de las rutas de biosíntesis de esfingolípidos y éter-fosfolípidos en respuesta a procesos patogénicos asociados al desarrollo de resistencia a insulina en obesidad mediante el uso de modelos de adipocitos in vitro.**





## MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1.- Sujetos y modelos experimentales. Criterios de selección y toma de muestras.

#### 3.1.1.- Cohorte de obesos con diferente perfil glucémico.

Se emplearon muestras de tejido adiposo subcutáneo (TASC) de individuos obesos sometidos a cirugía bariátrica en la unidad de Cirugía Digestiva del Hospital Universitario Reina Sofía. Todos los participantes incluidos en este estudio dieron su consentimiento informado por escrito. Además, los pacientes fueron seleccionados conforme a los siguientes criterios:

#### Criterios de inclusión:

- Hombres y mujeres caucásicos de edades comprendidas entre 18 y 60 años.
- Individuos obesos ( $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ ) normoglucémicos e individuos obesos con intolerancia a glucosa/resistencia a insulina/diabetes tipo 2 que sean sometidos a cirugía bariátrica y que no presenten otras patologías subyacentes en la exploración física y pruebas realizadas, al margen de las asociadas al exceso de peso

#### Criterios de exclusión:

- Diabetes mellitus tipo 2 en tratamiento con insulina.
- Enfermedad sistémica grave no relacionada con la obesidad (enfermedad infecciosa, cáncer, nefropatía o hepatopatía grave) o enfermedad cardiovascular mayor en los 6 meses previos a la inclusión del estudio
- Embarazo o lactancia
- Enfermedad inflamatoria aguda o crónica

Posteriormente, los pacientes obesos se subclasificaron en tres grupos con IMC y *edad equiparables*: normoglucémicos (NG, Glucosa < 100 mg/dL y HbA1c < 5,7 %, n = 4), pacientes con intolerancia a glucosa o pre diabéticos (IGT, Glucosa < 126 mg/dL y HbA1c de 5,7 a 6,4 %, n = 5) y diabéticos tipo 2 (T2D, Glucosa > 126 mg/dL y HbA1c > 6,4 %, n = 5), siguiendo los criterios del Comité de Expertos sobre el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes (American Diabetes Association, 2019). En la Tabla 1 se detallan los parámetros antropométricos asociados a los pacientes incluidos en este estudio.

Tabla 1.- Características antropométricas y bioquímicas de los sujetos incluidos en el estudio.

	NG	IR	T2D
N	5	5	5
Edad (años)	45.8 ± 4.2	42.6 ± 5.1	45.8 ± 9.7
Género (hombres/mujeres)	(1/4)	(2/3)	(3/2)
Peso (Kg)	133.6 ± 15.6	133.0 ± 2.9	167.9 ± 10.8 <sup>bb</sup>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	50.3 ± 3.4	49.1 ± 0.8	55.84 ± 12.5 <sup>b</sup>
Glucosa (mg/dL)	94.8 ± 4.1	111.0 ± 3.0 <sup>a</sup>	222.5 ± 52.3 <sup>aaa,bbb</sup>
HbA1c (%)	5.3 ± 0.2	6.1 ± 0.1 <sup>aa</sup>	10.1 ± 2.3 <sup>a, bb</sup>
Triglicéridos (mg/dL)	134.3 ± 23.9	125.2 ± 10.0	175.0 ± 40.9
Colesterol (mg/dL)	166.8 ± 10.0	185.0 ± 8.0	201.4 ± 43.3
HDL (mg/dL)	47.5 ± 4.9	47.8 ± 5.0	37.4 ± 8.1
LDL (mg/dL)	96.3 ± 3.2	131.2 ± 13.9	102.8 ± 25.0

Los datos se expresan como la media ± ESM. El p-valor se analizó utilizando la prueba T Student. <sup>a</sup> p <0.05, <sup>aa</sup> p <0.01, <sup>aaa</sup> p <0.001 vs NG; <sup>b</sup> p <0.05, <sup>bb</sup> p <0.01, <sup>bbb</sup> p <0.001 vs IR. Abreviaturas: NG, normoglucémicos; IR, insulino-resistentes; T2D, diabéticos tipo 2; IMC, índice de masa corporal; HbA1c, hemoglobina glicosilada; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad.

### 3.1.2.- Modelo experimental *in vivo*: obesidad inducida por dieta.

Se emplearon ratas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar, procedentes del animalario de la Universidad de Córdoba. Para reproducir las condiciones presentes durante la obesidad, el grupo obeso fue criado en camadas pequeñas de 4 animales (*Small litter*, SL) para inducir una sobrenutrición postnatal y una vez alcanzado el destete, fueron sometidos a una intervención con dieta alta en grasa (HFD, Diet D12451, 45 % contenido de grasas; Research Diets Inc., New Brunswick, New Jersey). Por su parte, el grupo control fue criado en camadas de 12 animales (*Normal litter*, NL) a los que posteriormente se les administró una dieta baja en grasa (LFD, Diet D12450B, 10 % contenido de grasas; Research Diets Inc.).

Por otra parte, se llevaron a cabo estudios complementarios de los niveles de glucosa en sangre en ambos grupos mediante pruebas de tolerancia a la glucosa (GTT) y a la insulina (ITT). En la prueba GTT, se midieron los niveles basales de glucosa en sangre durante la hora previa y tras aplicar una inyección intraperitoneal de glucosa (1 g/kg de peso corporal), se volvieron a medir las concentraciones de glucosa a los 20, 60 y 120 min. Del mismo modo, en la prueba ITT, se aplicó una inyección intraperitoneal de insulina (0,75 UI/kg de peso corporal) y se midieron las concentraciones de glucosa a los 20, 60 y 120 min posteriores a la inyección.

En todo momento, los animales se mantuvieron en unas condiciones de temperatura adecuada (22-24 °C) y un período de luz-oscuridad de 12 h, con acceso libre a comida y bebida. Asimismo, todos los experimentos con animales fueron revisados y aprobados por el comité ético de la Universidad de Córdoba, de acuerdo con la normativa europea y española para el uso de animales de experimentación animal.

Finalmente, para la obtención de las muestras de tejido adiposo, los animales se sacrificaron por decapitación y tras la disección de los tejidos, éstos fueron colocados en tubos estériles de 2 ml e inmediatamente congelados con N<sub>2</sub>, siendo almacenados hasta su uso en un congelador de -80 °C.

### 3.1.3.- Modelo experimental *in vitro*: adipogénesis y modelos de hiperglucemia/hiperinsulinemia e inflamación

#### 3.1.3.1.- Cultivo y diferenciación de línea celular 3T3-L1.

En el presente estudio, se ha utilizado la línea celular 3T3-L1 (American Type Culture Collection; LGC Standards S.L.U., Barcelona) procedente de fibroblastos de ratón, y en los cuales se induce el proceso de adipogenesis mediante la exposición a un cóctel hormonal compuesto de insulina, dexametasona y 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). Para llevar a cabo la experimentación, las células fueron sembradas en botellas de 150 cm<sup>2</sup> a una densidad de 2000 células/cm<sup>2</sup> con medio de cultivo de mantenimiento [DMEM, (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina 4 mM, antibiótico-antimicótico al 1% (v/v) y suero de neonato bovino (NCS) al 10 % (v/v)] e incubadas a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se refrescó cada 2 días hasta alcanzar un grado de confluencia mínima del 70-80 %. Una vez alcanzado el grado de confluencia necesaria, se llevaron a cabo subcultivos celulares en placas de 6 y 12 pocillos (3000 células/cm<sup>2</sup>), dependiendo del experimento, y se mantuvieron durante 2-3 días en medio de cultivo de mantenimiento antes de iniciar el proceso de diferenciación adipocitaria. Para inducir la diferenciación a adipocitos, las células se incubaron a Día 0 con medio de diferenciación base [DMEM suplementado con 4,5 g/L glucosa, 4 mmol/L L-glutamina, 1 % solución antibiótica-antimicótica (v/v), 1,5 g/L bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) y 10 % suero fetal bovino (FBS) (v/v)], 10 µg/mL insulina, 0,25 µM dexametasona y 0,5 mmol/L IBMX]. Transcurridas las 72 h, este medio se sustituyó por medio de diferenciación base suplementado con 10 µg/mL de insulina y se incubó durante otras 72 h. A partir de entonces (Día 6 de Diferenciación), el medio fue refrescado cada 48 h hasta alcanzar el día 9 de diferenciación.

### 3.1.3.2.- Modelos *in vitro* de adipocitos 3T3-L1: hiperglucemia/hiperinsulinemia (HGHI) e inducción de ambiente proinflamatorio (TNF $\alpha$ ).

Con el objetivo de emular algunas de las condiciones fisiopatológicas más relevantes asociadas al desarrollo de obesidad y resistencia a insulina, se utilizaron dos modelos celulares *in vitro* basados en la administración de concentraciones elevadas de glucosa e insulina (HGHI) o la exposición de los adipocitos al agente proinflamatorio TNF $\alpha$ . Concretamente, las células a día 6 de diferenciación fueron cultivadas previamente en un medio de pretratamiento [DMEM suplementado con 1 g/L de glucosa, L-glutamina 2 % (v/v), solución antibiótica-antimicótica 1 % (v/v), NaHCO<sub>3</sub> 1,5 g/L y albumina libre de ácidos grasos (BSA-FFA) 0,5 %] durante 2 h. Pasado este tiempo, las células fueron sometidas en ambos casos y durante 24 h a: i) un tratamiento con alta concentración de glucosa (4,5 g/L) e insulina (100 nM) o ii) un tratamiento con TNF $\alpha$  (5 nM).

### 3.1.3.3.- Ensayos de viabilidad celular.

Para determinar la viabilidad de los modelos celulares *in vitro* anteriormente descritos, se utilizó el ensayo MTT [Bromuro 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, (Sigma-Aldrich, Madrid, España)]. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del compuesto por parte de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, de manera que permite evaluar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas y de manera indirecta medir supervivencia y proliferación celular. Para llevar a cabo este ensayo, se preparó una solución de MTT a una concentración de 0,1 mg/mL en medio de pretratamiento sin rojo fenol [DMEM suplementado con 1 g/L de glucosa, L-glutamina 2 % (v/v), solución antibiótica-antimicótica 1 % (v/v), bicarbonato sódico 1,5 g/L y albumina libre de ácidos grasos (BSA-FFA) 0,5 %]. Como paso previo, las células fueron lavadas con PBS 1x para eliminar restos de medio de cultivo y acto seguido, fueron incubadas con la solución de MTT durante 3 h en oscuridad, a 37 °C y en una atmósfera con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Una vez finalizado el tiempo de incubación, la solución con MTT fue retirada y se añadió 1 ml por pocillo de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar los cristales generados durante la reacción del compuesto. Finalmente, la viabilidad celular fue determinada, siguiendo las instrucciones del fabricante, mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm (FlexStation 3 Microplate Reader, BioNova científica, s.l., Madrid).

### 3.2.- Aproximaciones ómicas para el estudio del tejido adiposo.

#### 3.2.1.- Análisis del perfil lipídico de secciones histológicas mediante espectrometría de masas MALDI-Imaging.

Para llevar a cabo el análisis de distribución espacial de lípidos mediante MALDI-Imaging (MALDI-IMS), se emplearon muestras congeladas de tejido adiposo subcutáneo (TASC) murino. Este procedimiento requiere de un complejo protocolo de optimización, debido tanto a la complejidad de la propia muestra, altamente enriquecida en lípidos, como de la técnica en sí, por su menor estandarización en estudios de lipidómica, en comparación con estudios proteómicos. Además de en esta sección, se proporcionan detalles sobre el proceso de optimización del protocolo de MALDI-IMS empleado en este estudio en la sección de Resultados ([ver apartado 4.1](#)).

Como paso previo a la obtención de cortes seriados, las muestras fueron talladas en bloques y fijadas a un soporte con ayuda del compuesto Tissue-Tek® O.C.T.™. De este modo, y usando un criostato (CM1860UV; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), se obtuvieron secciones histológicas de 14-16 µm de grosor a -35 °C de temperatura. Los experimentos se llevaron a cabo para cada muestra por triplicado y los cortes seriados fueron montados por descongelación sobre portaobjetos conductivos recubiertos con óxido de indio y estaño (Indium Tin Oxide, ITO) solos, o en combinación con una cinta adhesiva de carbono (Carbon Conductive Tape, CCT). Por otra parte, para el bloque de experimentos con muestras embebidas, se utilizaron una solución acuosa de gelatina-carboximetilcelulosa (relación 10:5:85, % p/v) o agarosa. Una vez montadas sobre el portaobjetos, las muestras fueron secadas con la ayuda de un desecador de vacío y posteriormente lavadas con una solución fría (4 °C) de acetato de amonio (pH 6.7) para reducir la formación de aductos con el analito (Angel et al., 2012).

Para la deposición de la matriz se llevaron a cabo tres protocolos diferentes ([Fig. 17](#)) y se emplearon cuatro matrices con propiedades y modo de ionización distintos: 2,5-Dihidroxiacetofenona (DHB), Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHA), 2-mercaptobenzotiazol (MBT) y 1,5-Diaminonaftaleno (DAN).



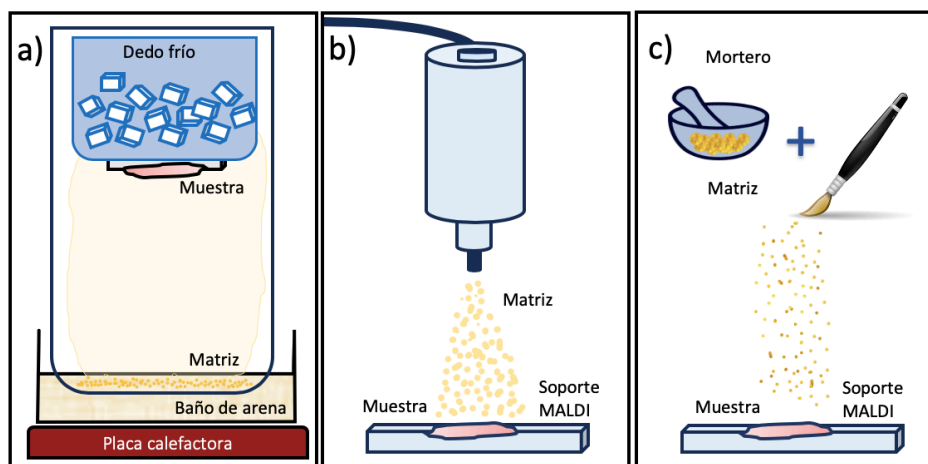


Figura 17. Representación esquemática de los métodos de deposición de la matriz empleados en los experimentos de MALDI-IMS usando muestras de tejido adiposo. (a) Estación de sublimación, (b) Estación robótica SunCollect, (c) Deposición seca de la matriz.

El primero de ellos (Fig. 17a) se adaptó a partir del método propuesto por Hankin JA et al. (2007) y consistió en la sublimación de la matriz en unas condiciones de temperatura y tiempos de deposición controladas dentro de una cámara de sublimación al vacío. El segundo método (Fig. 17b) fue llevado a cabo mediante el uso de la estación robótica de sprayer SunCollect (SunChrom GmbH, Alemania) de tal manera que la matriz fue depositada sobre la muestra a una velocidad de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , hasta completar un total de 20 capas. Por otra parte, se testaron distintos porcentajes de solvente orgánico (40-70 % de ACN) y se añadió ácido trifluoroacético (TFA 0.2 %) a la matriz para optimizar el rendimiento en el proceso de deposición y mejorar la relación señal/ruido. El tercer y ultimo protocolo (Fig. 17c) está basado en la aplicación de la matriz por medio de estrategias de deposición libres de solvente orgánico. Para ello, la matriz fue molida en un mortero hasta obtener un polvo fino y con la ayuda de una espátula y un pincel, se depositó sobre la superficie de la muestra. En último lugar, el exceso de matriz se retiró usando una corriente de nitrógeno libre de oxígeno.

En todos los procedimientos descritos anteriormente, los parámetros fueron estrictamente controlados para asegurar tanto la eficiencia de ionización como la reproducibilidad del método (Tabla 2).

Tabla 2.- Condiciones empleadas para la deposición de la matriz de ionización en muestras de tejido adiposo.

	Sublimación		Sprayer	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración (mg/mL)	ACN/H <sub>2</sub> O
DHA	110	6.5	15	90:10
DHB	120	7	60	50:50
DAN	110	6.5	10	60:40
MBT	150	7.5	10	70:30

DHA: 2,5-Dihidroxiacetofenona, DHB: Ácido 2,5-dihidroxibenzoico, DAN: 1,5-Diaminonaftaleno, MBT: 2-mercaptobenzotiazol, ACN/H<sub>2</sub>O: acetonitrilo: agua destilada.

Los espectros fueron obtenidos en polaridad positiva usando un espectrómetro de masas 5800 MALDI-TOF/TOF (AB Sciex Instruments, Foster City, CA), equipado con un láser Nd:YAG de 355 nm de longitud de onda. El análisis espectral de todos los iones se llevó a cabo en un rango  $m/z$  de 350 a 1100, a una resolución lateral de 150  $\mu\text{m}$  entre pixeles, acumulando un total de 100 disparos por posición de escaneo. La potencia del láser fue ajustada en cada caso hasta unos valores finales comprendidos entre los 5600-5800 (u.a.), dependiendo de la matriz y del protocolo de deposición empleado. Para la calibración interna de los espectros de MALDI-IMS, se utilizaron 625 fmol/mL de una mezcla de calibrantes compuesta por reactivos comerciales de Bradiquinina (BF1-7) y Angiotensina II (AT2). De este modo, se utilizaron los picos correspondientes a BF1-7 ( $m/z = 757.40$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) y AT2 ( $m/z = 1046.54$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) y se seleccionaron sólo aquellos picos con una tolerancia de masas por debajo de 20 ppm, una desviación máxima de 0.001 ppm en masas y una relación señal/ruido por encima de 100. Asimismo, las muestras fueron analizadas de manera aleatoria para evitar posibles sesgos en la interpretación de espectros, ya sea por variaciones en la sensibilidad del espectrómetro de masas o por degradación de la matriz de ionización.

### 3.2.2.- Identificación y cuantificación de lípidos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC/MS-MS).

Los extractos lipídicos fueron obtenidos a partir de muestras congeladas de tejido adiposo subcutáneo del modelo murino y de individuos obesos. Concretamente se usó un n=5 de cada grupo de pacientes (NG-IGT-T2D), y un n=3 de cada grupo animal (NL/LFD vs. SL/HFD).

Para llevar a cabo la optimización de la extracción de lípidos del tejido adiposo, se llevaron a cabo dos estudios complementarios. En el primer estudio, se probaron dos tipos de extractantes con propiedades distintas (MTBE: metil tert-butil éter y CM: cloroformo/metanol, 1:1) y un protocolo de extracción sólida de la muestra (SPE) para potenciar la identificación de lípidos (López-Bascón et al., 2018) . Para ello, se colocaron 100 mg de tejido adiposo en hielo y posteriormente fueron homogeneizados en 250  $\mu$ L de *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (D-PBS, 1x). Acto seguido, se sonicaron las muestras durante 4 min en hielo ( 8 ciclos de 30 segundos) y tras ello, se incubaron a 35°C durante 15 min para promover la solubilización de lípidos en el buffer empleado. Una vez completada la incubación, se dejaron reposar en hielo durante 30 min y después se centrifugaron durante 15 min a 16000  $\times g$  y 4°C de temperatura. Finalmente, los lípidos se concentraron en la fracción superior, la cual fue recogida y dividida a su vez en dos fracciones para probar las distintas metodologías de extracción (CM, MTBE y SPE).

En el segundo estudio, se llevó a cabo un protocolo de extracción de lípidos generales previamente descrito (L. D. Roberts et al., 2014). En este caso, se homogenizaron 100 mg de tejido adiposo en 600  $\mu$ L de cloroformo/metanol (relación 2:1 v/v, *Método de Folch*) y posteriormente se sonicaron durante 15 min a 4 °C (3 series de 5 min). Acto seguido, se añadieron 600  $\mu$ L de cloroformo y 400  $\mu$ L de metanol/agua (relación 1:1 v/v) y se mezclaron las muestras con la ayuda de un vórtex, como paso previo a su centrifugación durante 20 min a 16000  $\times g$ . El proceso de extracción se llevó a cabo por duplicado, y las fases resultantes se combinaron por separado (orgánica vs. acuosa). Los extractos fueron secados con una corriente de nitrógeno y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

En último lugar, el análisis de los extractos lipídicos se llevó a cabo usando dos equipamientos distintos. En el primer estudio de tejido adiposo murino, se utilizó un sistema de cromatografía líquida (LC) Agilent Serie 1200, acoplado a un espectrómetro de masas híbrido (QTOF) Agilent 6540 UHD (Santa Clara, CA, EE.UU.). En este caso, el detector QTOF estaba equipado con una fuente de ionización por electropulverización doble (eluido cromatográfico y solución de referencia) para poder calibrar en modo continuo cada una de las  $m/z$  detectados. Los eluidos cromatográficos se analizaron mediante espectrometría de masas en tándem en modo de alta resolución.

En el segundo estudio, con tejido adiposo murino y humano, se usó un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) UltiMate 3000, acoplado a un analizador de tipo triplecuadrupolo (QqQ) TSQ Quantum™ (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). El detector QqQ se equipó con una interfase de electrospray a alta temperatura (HESI, Thermo) y la separación de lípidos por cromatografía se llevó a cabo mediante el uso de columnas Kinetex 2.6  $\mu\text{m}$  C18 100 Å (100 mm  $\times$  3 mm) protegidas con una precolumna C18 (4 mm  $\times$  3 mm), ambas adquiridas en la casa comercial Phenomenex (Madrid). En ambos estudios, la estrategia empleada para la determinación de las especies lipídicas fue muy similar a la descrita por López-Bascón *et al.*, 2018 y una descripción más detallada puede encontrarse en la publicación de Fernández-Vega *et al.*, 2020.

### 3.2.3.- Tinción de hematoxilina-eosina.

Las secciones de tejido adiposo subcutáneo congelado fueron teñidas con Hematoxilina de Mayer (catiónica) para visualizar los núcleos de las células (básofilos) y con Eosina (aniónica) para teñir componentes básicos (acidófilos) como el citoplasma celular. El protocolo empleado consistió inicialmente en la hidratación de las secciones histológicas y su posterior tinción con hematoxilina durante 15 min. Acto seguido, se lavaron las muestras con agua destilada (3 series de 5 min) y se tiñeron con eosina durante 60 segundos. Tras lavar nuevamente las muestras, se procedió a su sellado con medio de montaje Eukitt®. Finalmente, usando un microscopio Leica DM2000 y sus objetivos 4  $\times$  y 20  $\times$ , se obtuvieron imágenes ópticas de cada sección histológica, empleado para ello el software del propio fabricante (versión 4.8).

### 3.2.4.- Análisis Bioinformático.

Dada la alta dimensionalidad de los conjuntos de datos que se generan durante la experimentación, se requiere de una etapa inicial de pre-procesamiento que permita reducir las variabilidades inherentes al proceso de adquisición de datos. De esta manera, el análisis de los datos obtenidos durante la experimentación se llevó a cabo en dos etapas claramente definidas: i) pre-procesamiento, ii) análisis funcional y estadístico de los resultados. Para llevarlo a cabo, los archivos brutos originales fueron convertidos a formato imzML y sometidos a un procesamiento inicial con la herramienta SpectralAnalysis, para seleccionar aquellas masas con un error inferior a 20 ppm. Con ayuda del software Cardinal R package (v1.10.0), los archivos imzML fueron normalizados usando el método de la Corriente Total de Iones (TIC). Acto seguido, con el fin de reducir el ruido electrónico y corregir la línea base, se filtraron los datos en bruto y se aplicó un *binning* total de 0.015 al conjunto de los datos procesados.

Por su parte, el análisis funcional y estadístico de los datos se llevo a cabo por medio de la herramienta online MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>). El conjunto de datos fue sometido inicialmente a un filtrado por rango intercuartílico (IQR) y posteriormente transformado a escala logarítmica para facilitar su manejo y posterior visualización. Asimismo, los datos fueron normalizados usando la herramienta *Auto-scaling*, la cual divide la media de cada variable entre su desviación estándar. Finalmente, para el estudio del comportamiento de las variables de forma individual se emplearon métodos de análisis como el *Fold Change* o el t-test, mientras que el estudio de la correlación entre variables se llevó a cabo por medio del análisis discriminante de la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA).

### 3.3.- Western Blotting

#### 3.3.1.- Obtención de extractos proteicos.

Se llevó a cabo un análisis de expresión proteica de las enzimas implicadas en la biosíntesis de lípidos y de la adipoquina, adiponectina, en células 3T3-L1 con el objetivo de analizar el comportamiento de estas proteínas tanto en el proceso de adipogénesis (Días 0-3-6-9) como tras la exposición a los tratamientos de HGHI y  $\text{TNF}\alpha$  en células a día 6 de diferenciación. Para llevarlo a cabo, el día de los experimentos, las células fueron previamente lavadas 3 veces con PBS 1x frío, y acto seguido, fueron recogidas con la ayuda de un *scraper* y lisadas añadiendo 300  $\mu\text{L}$  de tampón SDS-DTT (0,5 M Tris-HCl pH 7,4, 4 % SDS, glicerol puro, 1 M DTT, azul de bromofenol y agua destilada), previamente calentado a 65  $^{\circ}\text{C}$ . Las muestras recogidas fueron sonicadas durante 30 segundos y acto seguido se calentaron a 95  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos para favorecer la desnaturalización de las proteínas. Finalmente, el extracto proteico se almacenó a -20  $^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

#### 3.3.2.- Electroforesis desnaturalizante y electrotransferencia.

Una vez preparados los extractos proteicos, se ajustaron las muestras a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y se cargaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína/pocillo en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 %. Conjuntamente, se cargaron 3  $\mu\text{L}$  del marcador Precision Plus Protein™ Dual Color (Rango 10-250 kDa) (Bio-Rad, Madrid, España) por cada gel y como referencia de peso molecular. Para llevar a cabo la electroforesis desnaturalizante, se utilizó el sistema Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad) y los geles fueron sumergidos en un tampón de electroforesis (0,25 M Tris, 0,03 M SDS y 1,9 M Glicina). Inicialmente, se aplicó un voltaje de 80 V durante 10 minutos para concentrar todas las proteínas en el gel concentrador (4 % de poliacrilamida) y seguidamente, se aumentó hasta los 120 V hasta que el frente de proteínas alcanzó el final del gel separador (10 % de poliacrilamida). Tras finalizar la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioTrace NT, Pall Corp., Pensacola, FL, EE.UU.) mediante transferencia húmeda, con recirculación continua del tampón de transferencia [25 mM Tris, 190 mM Glicina, 0,2 % SDS ( $m/v$ ), 20 % metanol ( $v/v$ )]. La electrotransferencia de proteínas a la membrana se llevó a cabo manteniendo un amperaje constante de 330

mA y durante 1 h en frío, para evitar un aumento de temperatura que facilite la aparición de burbujas en el seno del gel. Con el objetivo de visualizar el patrón de bandas y de esta manera poder normalizar las muestras, las membranas de nitrocelulosa fueron teñidas con Rojo *Ponceau* [0,1 % Rojo *Ponceau* (m/v) en 1 % ácido acético (v/v)] durante 10 min en agitación. Tras la digitalización de las bandas, las membranas fueron desteñidas con ácido acético al 1 % y posteriormente lavadas con tampón de lavado TTBS [(Tris- HCl 25 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, pH 7,5; Tween-20 al 0,0 5% (v/v)]. Finalmente, las membranas fueron bloqueadas con tampón de bloqueo [leche desnatada en polvo (Bio-Rad) al 5 % (m/v) en TTBS] durante 1 h como paso previo a la incubación con el anticuerpo primario.

### 3.3.3.- Inmunodetección de proteínas.

Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 3) diluido en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C y en agitación. A continuación, se lavaron 3 veces con tampón TTBS 1x durante 10 min en agitación y posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con peroxidasa de rábano (Anti-IgG de conejo, 1:10000, Jackson Inmunoresearch, Ref. 111035144; Anti-IgG de ratón, 1:2500, Sigma- Aldrich, Ref. A-9044) diluido en tampón de bloqueo, durante una 1 h y a temperatura ambiente.

Antes de proceder al revelado de las membranas, éstas se lavaron tres veces con TTBS 1x durante 10 min en agitación. Para la inmunodetección de proteínas en membrana, se empleó el kit de detección *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad) y la estación de documentación de geles LAS 4000 (Software ImageQuant LAS 4000 V1.2, GE Healthacare, Little Chalfont, Reino Unido). Las imágenes adquiridas se procesaron con el software ImageJ (v1.52p, NIH, EE.UU.) y en ellas se cuantificó la media de la densidad óptica (DO) detectada en cada banda inmunoreactiva. Finalmente, como marcador de carga, todos los valores se han normalizado con respecto a la DO correspondiente a su carril en la digitalización previa de la membrana teñida con rojo *Ponceau*.

Tabla 3.- Listado de anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo 1º	Huésped	Peso Molecular	Dilución	Referencia	Casa Comercial
Anti-SMS1	Conejo	49 kDa	1:1000	PA1-12761	Thermo Fisher
Anti-SMS2	Conejo	49-55 kDa	1:1000	PA5-26802	Thermo Fisher
Anti-CEPT1	Conejo	55 kDa	1:750	PA5-23876	Thermo Fisher
Anti-Alkyl-DHAP synthase	Conejo	73 kDa	1:1000	Ab184186	Abcam
Anti-nSMase	Conejo	49 kDa	1:2000	Ab131330	Abcam
Anti-ASAH1	Conejo	52 kDa	1:1000	Ab74469	Abcam
Anti-GRP78	Ratón	78 kDa	1:1000	sc-376768	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Catalase	Ratón	60 kDa	1:1000	Ab16771	Abcam
Anti-GSS	Conejo	52 kDa	1:1000	Ab133592	Abcam
Anti-Adiponectin	Ratón	32 kDa	1:1000	NBP2-22450	Novus Biologicals
Anti-CHOP	Ratón	27 kDa	1:1000	#2895	Cell Signalling

Se indica el huésped en que se obtuvieron los anticuerpos, el peso molecular de la proteína que detectan, dilución empleada, referencia y casa comercial.

### 3.4.- Análisis de expresión génica.

El estudio de expresión génica se llevó a cabo usando muestras congeladas de células 3T3-L1, tanto a lo largo del proceso de diferenciación (Día 0-3-6-9) como tras la exposición de células a día 6 a los tratamientos de HGHI o  $TNF\alpha$ . El listado de genes de interés seleccionados en este estudio, incluyendo genes que participan en la síntesis de éter-fosfolípidos, ceramidas y esfingomielinas, se recoge en la [Tabla 4](#).

Tabla 4.- Listado de genes seleccionados para su estudio por qPCR.

	GEN	REFERENCIA	NOMBRE	FORWARD	REVERSE
Mus Musculus	CERS	NM_138647	Ceramide Synthase	TGCTGTTGCTCCTGATGGT	TCTGAGCTCCAGAGTGTCGT
	CERT	NM_023420	Ceramide Transferase	TGCCATCTGGAGACACCTTT	TTGCATCACCACTACATCCT
	SMS1	NM_001168525	Sphingomyelin Synthase 1	CAGGACCATGAAGGAAGTGG	ACTCGGTACAGTGGGGGTTT
	SMS2	NM_028943	Sphingomyelin Synthase 2	TTCTCGTAGCGCATGAACACT	TGAGCCTTGACATTCTTCTC
	SMPD2	NM_009213	Sphingomyelin Phosphodiesterase 2	TGCTGAGTACAGCCGACAGA	CTTTGGGGTGATATTGAGG
	CERK	NM_145475	Ceramide Kinase	TCCGTGCTGTGGGTGAAAC	GAGCGGGCATCGGCAC
	FAR1	NM_027379	Fatty Acyl-CoA Reductase 1	GCAGCCTGGTATTCTGGAGTT	CCCCAGTGGAAGGATTAG
	GNPAT	NM_010322	Glyceronephosphate O- Acyltransferase	ATGCCTTAGCAGCTTTCGTG	GTTTTCAGTGGCTGGTTTT
	AGPS	NM_172666	Alkyl- dihydroxyacetonephosphate	AAGTACGGTTCGGTGGCTTT	GTCCATGAGGCGGATAGATG
	AGPAT3	NM_053014	1-Acylglycerol-3-Phosphate O- Acyltransferase 3	CCTCATCTGACGTTCTTGG	CGCATCAGGTTATGGGTGTT
	CEPT1	NM_133869	Choline/Ethanolamine Phosphotransferase 1	GA TTGGAGGACCACCTTTTGG	CATTTTTGCCAACACCACCT
	CHPT1	NM_001146690	Choline Phosphotransferase 1	TGCTCTTTCGTTGGGATGTT	GTCCACATTGTTGCTCTC



Se indica el huésped para el que se diseñaron los cebadores (*Mus musculus*), su identificador en la base de datos del NCBI (ID o REFERENCIA), el nombre del gen y la secuencia de cada uno de los cebadores empleados (FORWARD y REVERSE).

#### 3.4.1.- Extracción de ARNm.

Para proceder a la extracción de ARN, las células se recogieron en 1 mL de Trizol (Tri® Reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante y se congelaron a -80 °C hasta finalizar la recogida de todas las muestras del estudio. Una vez se obtuvieron todas las muestras, los extractos se descongelaron y se dejaron incubar durante 5 min con 200 µL de cloroformo. A continuación, se centrifugaron los extractos durante 15 min a 12000 g y 4 °C de temperatura, favoreciendo así la separación de la fase acuosa (que contiene el ARN) y la fase orgánica, compuesta mayoritariamente de ADN y proteínas. Una vez recogida la fase acuosa, se le añadió isopropanol (relación 1:1) y se centrifugó a 12000 g y 4 °C durante 10 min. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante y tras secar el pellet, se lavó con 1 mL de etanol al 75 % y se volvió a centrifugar a 7500 g y 4 °C durante 5 min. Por último, el pellet final de cada muestra se reconstituyó en 11 µL de agua DPEC (Dietil-piro carbonato) y se calentó a 65 °C durante 5 min. Para la cuantificación del ARN, se midió la absorbancia de cada extracto a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop DS-11 (DeNovix, DE, EE.UU.).

#### 3.4.2.- Retrotranscripción del ARNm.

Para llevar a cabo la retro-transcripción del ARN a ADN copia (ADNc), se utilizó el kit comercial *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher, Waltham, MA, EE.UU.), usando 1 µL del reactivo *Random Hexamer primer* y 1 µg de ARN, completando el volumen hasta 12 µL con agua libre de nucleasas. Tras un período de incubación a 65 °C durante 5 min, se dejaron reposar las muestras en hielo mientras se procedía a la elaboración de la Máster Mix siguiendo las instrucciones del fabricante. Por cada reacción, se añadieron 4 µL del buffer 5x, 1 µL de RiboLock RNase inhibitor, 2 µL de de dNTP Mix 10 mM y 1 µL de RevertAid M-MuIV RT 200 U/µL. En cada muestra, se utilizaron 8 µL de la solución Máster Mix y tras un spin, se procedió a una incubación inicial a 25 °C durante 5 min, seguida de otra incubación a 42 °C durante 1 h.

### 3.4.3.- Diseño y validación de cebadores.

El diseño de las parejas de cebadores para cada gen se llevó a cabo usando el software Primer3 (V.0.4.0). Se fijaron los siguientes parámetros: tamaño del producto final (80-200 nucleótidos), longitud de *cebadores* comprendida entre 18-23 nucleótidos, porcentaje G-C entre 45-55 % y temperatura de alineamiento o *melting* ( $T_m$ ) de entre 60-61 °C. De los candidatos propuestos por el software, se seleccionaron preferiblemente aquellos que abarcaban varios exones de la secuencia diana y se solicitó su síntesis en la casa comercial StabVida (Caparica, Portugal).

Los *cebadores* liofilizados fueron resuspendidos en agua *Milli-Q* a una dilución 1:100 como paso previo a su validación en muestras control de ratón y humano. Partiendo de un stock de *cebadores* a una concentración inicial de 100  $\mu$ M, se preparó una dilución 1:10 y se ajustó el volumen al número de muestras a usar para llevar a cabo una PCR convencional. Para ello, se añadieron 1  $\mu$ L de *forward primer*, 1  $\mu$ L de *reverse primer*, 100 ng de ADN control, 12,5  $\mu$ L del reactivo Máster Mix 2x para PCR (Thermo Scientific, Waltham, MA, , EE.UU.) y se completó con agua libre de ARNasas hasta un volumen final de 25  $\mu$ L.

Asimismo, los cebadores fueron validados mediante una PCR convencional, usando muestras de control positivo con ADNc y muestras de control negativo sustituyendo el ADNc por agua libre de ARNasas. Para ello, las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 2 % en tampón TAE 1x (compuesto de tris, acetato y EDTA) al que se le añadió el reactivo *Red Safe™ Nucleic Acid Staining Solution* (iNtron Biotechnology, Seongnam, Corea) para teñir los ácidos nucleicos. Tras una electroforesis de 30 minutos a 80V, el gel fue visualizado con la cámara ultravioleta del sistema ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad) y procesado con el software Quantity One (versión 4.6.6).

### 3.4.4.- PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Los niveles de expresión de los genes seleccionados para su estudio fueron medidos por PCR a tiempo real utilizando el sistema LightCycler® 96 (Roche, Basel, Suiza). Tomando como partida los stocks de cebadores previamente resuspendidos a una concentración de 100  $\mu$ M, se preparó una mezcla de cebadores utilizando 10  $\mu$ L de primer forward, 10

μL de primer reverse y 80 μL de agua libre de nucleasas. Para preparar la Máster Mix, se usaron 0,5 μL/muestra de la dilución de los cebadores *Forward* y *Reverse*, 0,5 μL/muestra de agua libre de nucleasas y 5 μL/muestra del reactivo Máster Mix *GoTaq® qPCR Máster Mix* (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Acto seguido, usando una placa de 96 pocillos, se cargaron por duplicado 4 μL de una dilución 1:50 del ADNc correspondiente a cada muestra del estudio y 6 μL de la Máster Mix. Finalmente, los datos obtenidos se procesaron con el Software LightCycler® 96 SW (versión 1.1).

### 3.5.- Análisis estadístico.

En cada figura se representa el valor correspondiente a la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media), obtenido a partir de al menos tres experimentos independientes. Los análisis de las pruebas GTT e ITT, así como los resultados obtenidos por RT-qPCR en cultivos celulares, se llevaron a cabo usando un  $n = 6$ .

Para la comparación de los resultados obtenidos entre dos grupos experimentales, se utilizó o la prueba  $t$  de Student para datos paramétricos o la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos. En aquellos estudios donde se comparan más de dos grupos experimentales, el estudio estadístico se llevo a cabo por medio de un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido del método de la diferencia menos significativa (LSD) de Fisher. En ambos casos, las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas a partir de un nivel de confianza superior al 95% ( $P < 0,05$ )

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS/Windows versión 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) mientras que su representación gráfica se realizó con el software GraphPad Prism 7.0d (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.)



RESULTADOS



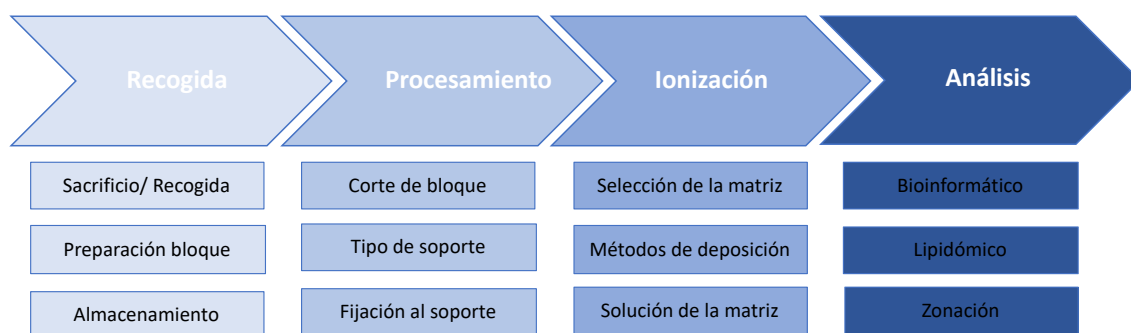
#### 4.1.- Optimización de un protocolo de MALDI-Imaging para el análisis del perfil lipídico del tejido adiposo en modelos murinos.

La técnica de MALDI-Imaging representa una innovadora herramienta para el descubrimiento de biomarcadores en histopatología ya que combina tanto la identificación de bioanalitos (proteínas, péptidos, lípidos, metabolitos...) como su distribución espacial en los tejidos analizados. La información obtenida por esta técnica se puede integrar con las imágenes proporcionadas por técnicas clásicas de histología, permitiendo así monitorizar los cambios fisiológicos que se producen en el tejido analizado durante el desarrollo de una patología concreta. Sin embargo, su uso en tejidos blandos y altamente enriquecidos en lípidos como el tejido adiposo no se había contemplado hasta la fecha, debido a la falta de protocolos específicos para su análisis.

Por ello, el objetivo principal de este estudio ha sido diseñar un protocolo de MALDI-Imaging que permita el análisis del perfil lipídico en muestras de tejido adiposo, y así poder investigar los cambios fisiopatológicos que se producen en el tejido en respuesta al desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina.

##### 4.1.1.- Estrategias de preparación de la muestra para su análisis mediante MALDI-IMS.

La preparación de la muestra constituye una etapa crítica para la obtención de resultados confiables en la técnica MALDI-Imaging (Richard J. A. Goodwin, 2012). Puesto que los analitos de interés también son caracterizados a nivel espacial dentro de la muestra, resulta esencial mantener la integridad estructural del tejido analizado para evitar un desplazamiento de estas moléculas con respecto a su posición anatómica original. Es por ello que, tomando como referente lo descrito previamente en la literatura (Thomas & Chaurand, 2014; Zemski Berry et al., 2011), en este trabajo se han ido adaptando cada una de las etapas principales de preparación de la muestra ([Fig.1](#)) conforme a las propiedades específicas del tejido adiposo.



**Figura 18. Esquema de las principales etapas de la preparación de muestras y posteriores puntos de control para la obtención de datos e imágenes por MALDI-IMS.** Como sucede en la mayoría de las técnicas ómicas empleadas para el análisis de muestras biológicas, es de vital importancia optimizar cada una de las etapas de preparación de la muestra para obtener resultados confiables. En este esquema se representan cada una de las etapas para la optimización y puesta a punto de un protocolo de análisis del tejido adiposo mediante la técnica MALDI-IMS.

#### ▪ RECOGIDA

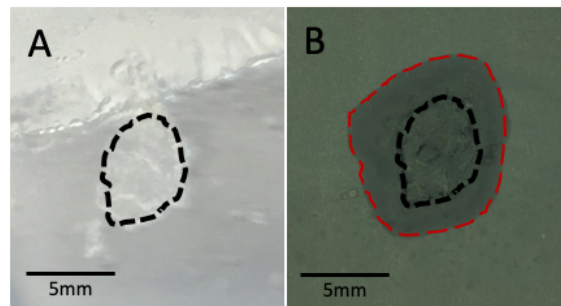
En primer lugar, se llevó a cabo una puesta a punto para la recogida óptima de las biopsias de tejido adiposo. Para ello, las muestras procedentes de modelos murinos de obesidad fueron lavadas con PBS1x tras su extracción con el objetivo de eliminar impurezas y restos de sangre.

A continuación, se probaron dos estrategias para la conservación de la muestra: i) almacenamiento del tejido en seco y ii) inmersión de tejidos en soluciones acuosas compuestas de polímeros. Por un lado, el almacenamiento en seco constituye el método estándar para el procesamiento de muestras biológicas y se obtuvieron mejores resultados en la obtención de cortes seriados cuando los tejidos habían sido almacenados previamente en moldes con forma cuadrada. Por otro lado, dado que el tejido adiposo presenta una consistencia blanda y carece de una morfología compacta, se llevaron a cabo experimentos para embeber las muestras en soluciones acuosas de gelatina-carboximetilcelulosa o agarosa. Finalmente, las muestras procesadas por ambos métodos se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.



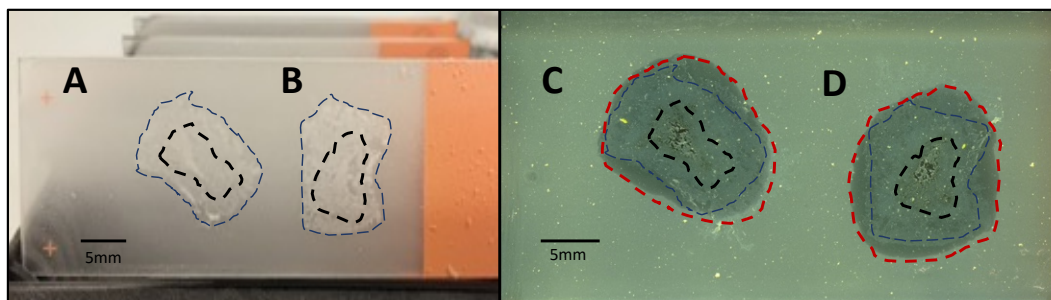
## ■ PROCESAMIENTO

A continuación, se llevó a cabo el procesamiento de la muestra para la obtención de secciones de tejido adiposo. Para ello y dadas las propiedades intrínsecas del tejido adiposo, las muestras fueron procesadas con la ayuda de un criostato en un rango de -20 a -35°C de temperatura. De forma paralela, se llevaron a cabo pruebas de corte en un rango de 4-20  $\mu\text{M}$  de grosor y a partir de los resultados obtenidos, se pudo concluir que el rango óptimo para la obtención de secciones histológicas en este tipo de muestras era de 14-16  $\mu\text{M}$  de grosor. Acto seguido, se aplicó una matriz de ionización sobre la muestra observándose una clara difusión del contenido lipídico de la muestra hacia la periferia (Fig.19)



**Figura 19. Procesamiento de muestras por congelación en seco.** Imágenes obtenidas antes (A) y después (B) de la aplicación de la matriz de ionización en muestras de tejido adiposo de rata obtenidas por congelación en seco. La línea negra discontinua corresponde al contorno de la sección de tejido obtenida mientras que la línea discontinua roja representa el avance de los lípidos presentes en la muestra hacia la periferia del tejido.

Paralelamente, se llevaron a cabo pruebas de corte usando las muestras embebidas en soluciones acuosas de gelatina-carboximetilcelulosa o en agarosa. El uso de este tipo de soluciones permitió obtener cortes de buena calidad en el mismo rango de grosor que con el método anterior (Fig.20, A-B). Sin embargo, tras la deposición de la matriz de ionización sobre la muestra, nuevamente se produjo la difusión y deslocalización de los lípidos presentes en la misma (Fig.20, C-D). En conclusión, dado que ninguno de los métodos probados era eficaz en la contención de los lípidos en la muestra, se optó por el uso del método de congelación en seco para evitar una excesiva manipulación del tejido.



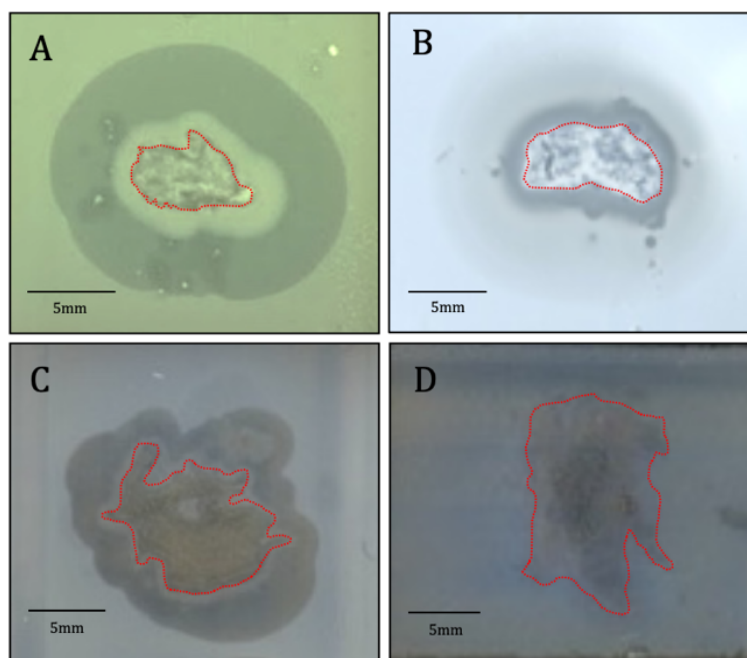
**Figura 20. Evaluación del método de seccionamiento en tejidos embebidos.** Imágenes obtenidas antes (A y B) y después (C y D) de la aplicación de la matriz de ionización en secciones de tejido adiposo de rata. La imagen de la izquierda muestra dos secciones de tejido adiposo embebidas en (A) gelatina o en (B) una solución mixta de gelatina-carboximetilcelulosa (ratio 10:5:85, % p/v). La imagen de la derecha muestra las dos secciones de tejido adiposo embebidas en (C) gelatina-carboximetilcelulosa o en (D) agarosa tras la aplicación de la matriz de ionización. En dichas imágenes se representa con una línea discontinua negra el contorno del tejido adiposo y con una línea discontinua azul el contorno del molde generado al embeber el tejido. Por otra parte, la línea roja discontinua representa el avance de los lípidos tras depositar la matriz de ionización sobre la muestra.

#### ▪ IONIZACIÓN

##### 4.1.2.- Comparación de matrices de ionización y métodos de deposición.

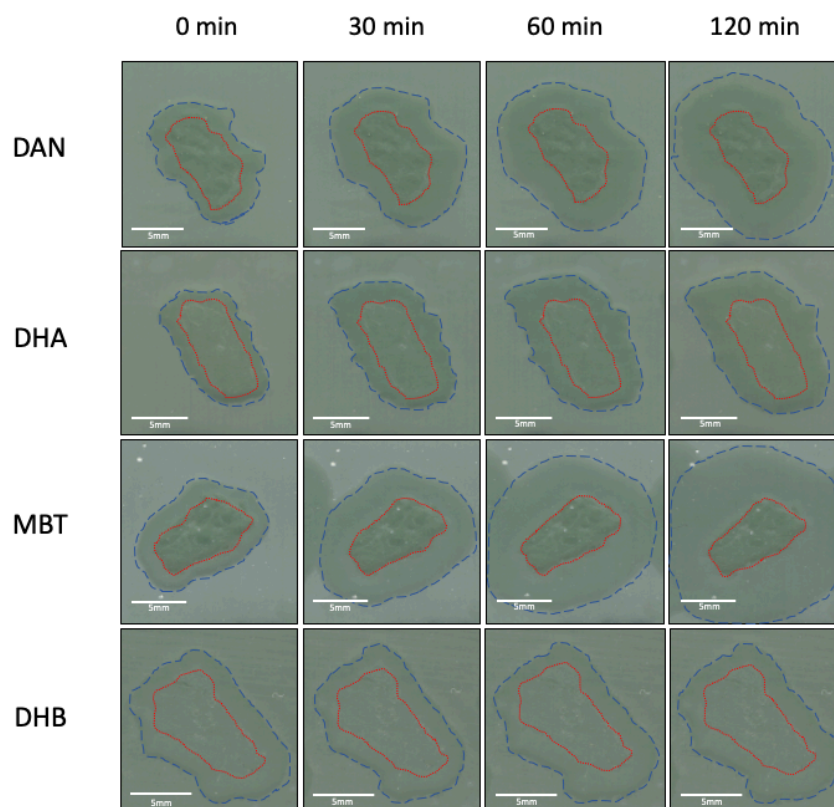
Previamente a su paso por el MALDI, la muestra debe ser recubierta con una matriz de ionización, cuya función principal es absorber la energía de un pulso de laser y después transmitirla a la muestra en forma de energía de excitación. Para optimizar la ionización del tejido adiposo, se probaron cuatro matrices con propiedades fisicoquímicas distintas: Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHA), 2-mercaptobenzotiazol (MBT), 1,5-Diaminonaftaleno (DAN) y 2,5-Dihidroxiacetofenona (DHB). Cada una de estas matrices fue depositada sobre la muestra mediante el uso de tres métodos diferentes: sublimación, estación robótica de sprayer y deposición en seco.

En primer lugar, la sublimación de la matriz a fase gaseosa permitía ionizar la muestra de manera inmediata sin la necesidad de usar solventes orgánicos que puedan afectar a la integridad de los analitos o favorezcan su movilidad. Sin embargo, la sublimación de todas las matrices testadas produjo una difusión de lípidos exacerbada desde la muestra hacia la periferia, generando así un característico halo sombreado alrededor de la periferia del tejido (Fig.21).



**Figura 21. Deslocalización de lípidos tras deposición de la matriz por sublimación.** Las secciones de tejido adiposo fueron depositadas sobre portaobjetos conductivos de ITO y posteriormente se recubrieron con la matriz DHA (A), MBT (B), DAN (C), o DHB (D) para su ionización. Los puntos rojos representan el contorno del tejido adiposo mientras que el halo sombreado alrededor del tejido corresponde al avance de los lípidos desde la muestra hacia la periferia.

En segundo lugar, el método de deposición por *sprayer* genera cristales muy pequeños de la matriz que se distribuyen de manera uniforme a lo largo de la muestra, lo cual favorece su homogeneización y posterior ionización. No obstante, tal y como se muestra en la [Fig.22](#), este método provocó el desplazamiento de lípidos desde la muestra hacia la periferia en todas las matrices testadas, un efecto que se exacerbaba conforme avanza el tiempo desde la deposición de la matriz. Cabe destacar que la difusión de lípidos se produjo en menor medida en aquellos experimentos donde se usaba DHA o DHB, siendo ésta última en la que se observaba un menor desplazamiento de analitos.

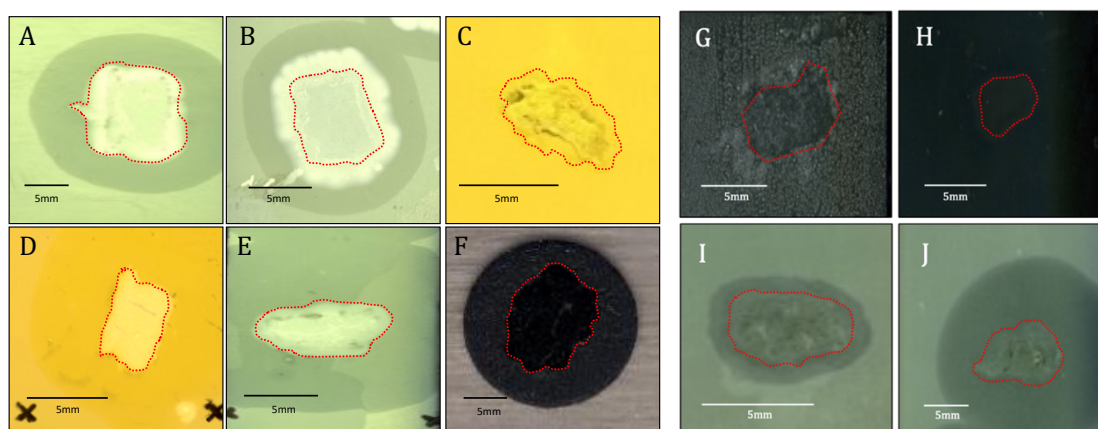


**Figura 22.** Deslocalización de lípidos tras deposición de la matriz usando la estación robótica SunCollect. Experimento *time-course* donde se muestra la difusión de lípidos desde la muestra en los 120 minutos posteriores a la deposición de la matriz de ionización. Las secciones de tejido adiposo de rata fueron depositadas sobre portaobjetos conductivos de ITO y se utilizaron cuatro matrices diferentes: DAN, DHA, MBT y DHB. Los puntos rojos representan el contorno del tejido adiposo mientras que la línea azul discontinua muestra el avance los lípidos desde la periferia de la muestra.

En tercer lugar, se llevaron a cabo experimentos de deposición de la matriz en seco. Este método ha sido utilizado previamente en el estudio de lípidos en tejidos ya que se obtienen buenos resultados en la extracción de los analitos sin necesidad de usar solventes orgánicos (Satu M. Puolitaival et al., 2008). Sin embargo, y en consonancia con lo descrito previamente (Li et al., 2016), el tamaño de los cristales formados afectó tanto a la resolución del experimento como a la reproducibilidad del mismo, siendo incompatible con la obtención de resultados extrapolables entre sí.

#### 4.1.3.- Estrategias alternativas para la mejora de la adherencia del tejido.

En este apartado, se probaron diferentes superficies de soporte que permitieran mantener la muestra adherida al soporte y contener además el avance de los lípidos tras depositar la matriz (Fig.23). Por un lado, se probaron soportes convencionales como los portaobjetos comunes de vidrio (Fig.23A) o portaobjetos tratados con óxido de estaño (*Indium Tin Oxide*, ITO) (Fig.23B). Por otro lado, se emplearon soportes especiales para MALDI basados en la polaridad (Fig.23C) y conductividad (Fig.23D) de las moléculas presentes en la muestra. Del mismo modo, se hicieron pruebas añadiendo un recubrimiento previo con poli-L-lisina (Fig.23E) o una cinta de carbón conductivo (Fig.23F) al portaobjetos ITO con el objetivo de inmovilizar la muestra en el soporte para MALDI. En ultimo lugar, se aplicaron sobre la muestra matrices inorgánicas como el nitrato de plata (Fig.23G) o el oro (Fig.23H) y matrices mixtas compuestas por Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHA) en combinación de Ácido 4-hidrazinobenzoico (Fig.23I) o Ácido ascórbico (Fig.23J).



**Figura 23. Optimización y comparativa de diferentes matrices y métodos de deposición.** El panel superior muestra el uso de superficies alternativas como estrategias de contención de lípidos y el mantenimiento de la estructura de la muestra: (A) portaobjetos estándar, (B) portaobjetos ITO, (C) soporte de MALDI sometido a un tratamiento hidrófilo, (D) soporte estándar de MALDI, (E) portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina y (F) portaobjetos ITO con cinta conductiva de carbón. En el panel derecho se muestra cómo afectaron los recubrimientos con nitrato de plata (G) y oro (H) o el uso de matrices mixtas como el Ácido 4-hidrazinobenzoico/DHA (I) y ácido ascórbico/DHA (J) a la capacidad de difusión de los lípidos contenidos en la muestra. Los puntos rojos representan el contorno del tejido adiposo y el halo sombreado el avance de los lípidos tras la aplicación de la matriz sobre la muestra.

De todas las superficies estudiadas, sólo aquella donde se usó la cinta de carbón conductiva fue eficaz para minimizar la difusión de los lípidos contenidos en la muestra. Por su parte, tanto el uso de matrices mixtas con aditivos y como el de matrices inorgánicas no proporcionó resultados positivos en la retención de lípidos en la muestra.

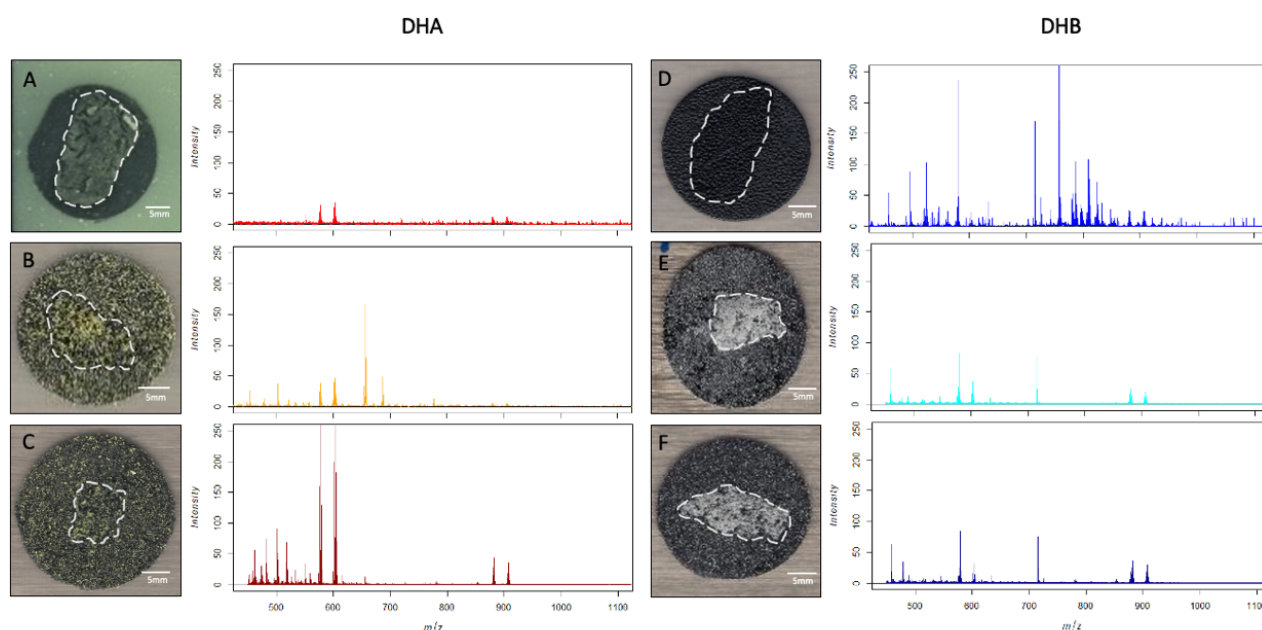
#### 4.1.4.- Métodos de deposición simple o mixta de la matriz.

El método de aplicación de la matriz influye de manera directa sobre la calidad de los espectros obtenidos, así como sobre el número de identificaciones que se detectan en los tejidos a analizar (Shimma & Sugiura, 2014). Una de las principales causas de pérdida de intensidad en la señal de analito corresponde al fenómeno de supresión iónica (Furey et al., 2013). Este efecto puede estar relacionados tanto con el tipo de matriz como de muestra o simplemente por la presencia de sustancias endógenas como lípidos y algunas sales (Furey et al., 2013). Para contrarrestar este efecto y potenciar la intensidad de señal detectada, se llevó a cabo un estudio comparativo entre los métodos de deposición de las matrices DHA y DHB ya que los mejores resultados en los experimentos con portaobjetos ITO se obtuvieron con dichas matrices. De esta forma, las muestras de tejido adiposo fueron montadas sobre cinta de carbón conductiva y posteriormente recubiertas con DHA o DHB mediante deposición por sprayer, deposición en seco o deposición mixta.

Los resultados revelaron que la aplicación de la matriz mediante el uso de un sprayer generó espectros con una mayor intensidad de la señal y un mayor número de picos en las muestras recubiertas con la matriz DHB frente a aquellas con DHA (Fig.24, A y D). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas al comparar ambas matrices mediante el método de deposición en seco (Fig.24, B y E) a pesar de que se detectaron picos de mayor intensidad tanto en el rango  $m/z$  550-650 usando la matriz DHA como en el rango  $m/z$  700-900 cuando se empleó la matriz DHB. Finalmente, la combinación de ambos métodos de deposición de la matriz proporcionó mejores resultados con la matriz DHA puesto que se observó un alto número de picos en el rango  $m/z$  de 350-600 en comparación los observados en la matriz DHB (Fig.24, C y F).



De esta forma, el mejor método para depositar la matriz DHA fue el mixto ya que se observaron tanto un mayor número de picos como una mayor intensidad de éstos (Fig.24, A-C). Por su parte, en el caso de la matriz DHB, tanto el promedio de intensidades de señal como el número de iones detectados al depositar DHB mediante un sprayer, fue sensiblemente superior con respecto a los métodos de deposición en seco (Fig.24D) o mixta (Fig.24F).



**Figura 24. Comparación múltiple de métodos de deposición simple y/o combinada de la matriz.** Las secciones de tejido adiposo de rata fueron depositadas sobre una cinta conductiva de carbón adherida a la superficie del portaobjetos ITO y posteriormente recubiertas con la matriz DHA (A-C) o DHB (D-F). Para depositar la matriz se emplearon varias estrategias de aplicación, incluyendo el uso de una estación robótica de sprayer (A y D), deposición en seco de la matriz (B y E) o una combinación ambos métodos (C y F). Las líneas blancas discontinuas representan el contorno del tejido adiposo.

Sobre la base de estos resultados, se puede concluir que la deposición simple de la matriz DHB mediante sprayer constituye el método más eficaz para la detección de lípidos en muestras de tejido adiposo depositadas sobre cinta de carbón conductiva.

#### 4.1.5.- Optimización de la solución de la matriz.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de preparación de la muestra en cortes de tejido adiposo, el siguiente objetivo fue optimizar la solución de la matriz. Esta etapa es esencial en la consecución de resultados ya que la composición del solvente de la matriz influye de manera significativa sobre la identificación de iones en el espectro. Por ello,

se probaron diferentes ratios de la mezcla del solvente acetonitrilo/agua (ACN/H<sub>2</sub>O, 40:60, 50:50, 60:40 y 70:30) para mejorar la eficiencia de ionización (Fig.25).

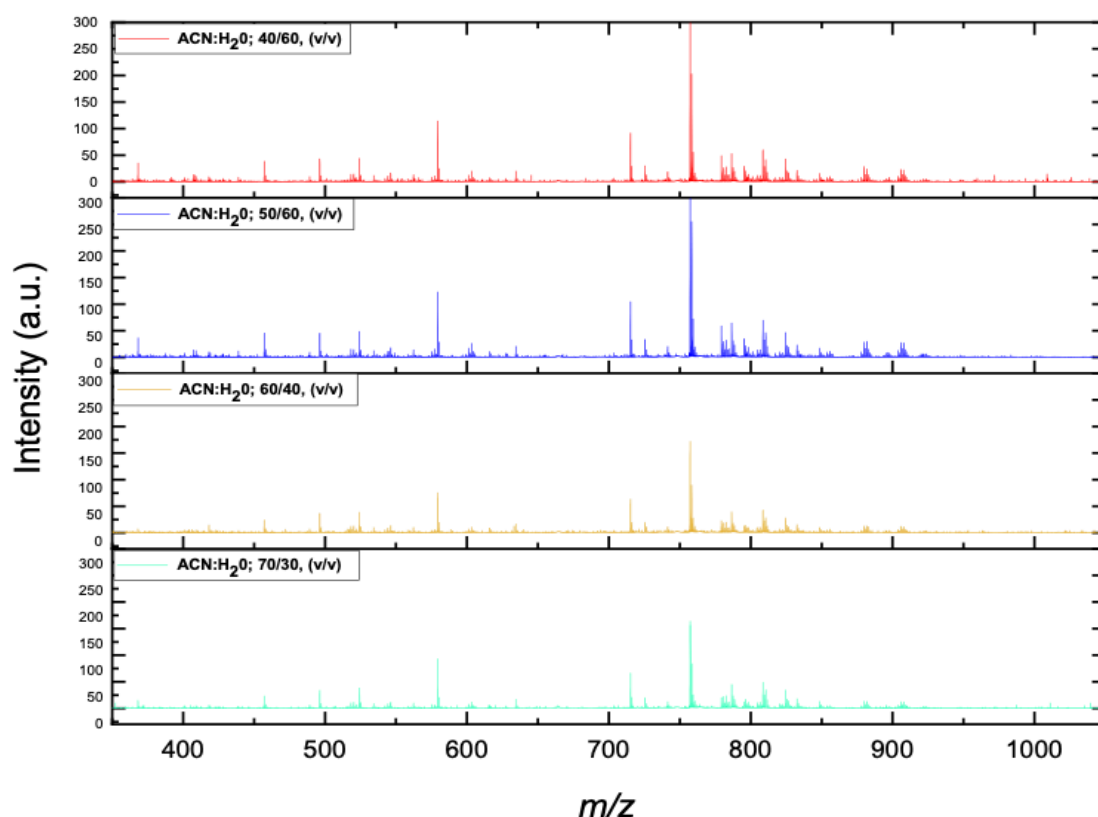


Figura 25. Análisis comparativo de los espectros generados utilizando diferentes proporciones de solvente orgánico en la solución de la matriz. La matriz DHB se disolvió a una concentración de 60mg/mL en una solución de acetonitrilo/agua destilada (ACN:H<sub>2</sub>O) en concentraciones crecientes del solvente orgánico (40-70%) y decrecientes de agua (60-30%), respectivamente. En la tabla adjunta se muestra una comparativa cuantitativa de las intensidades correspondientes a los 20 picos más relevantes de los espectros obtenidos. ACN: acetonitrilo; H<sub>2</sub>O: agua destilada.

<i>m/z</i>	Intensity (a.u.)			
	40:60	50:50	60:40	70:30
<b>368,24</b>	35,22935	34,09084	1,69163	2,38645
<b>496,32</b>	34,22473	45,38191	36,23886	30,72326
<b>496,32</b>	34,22473	45,38191	36,23886	30,72326
<b>524,35</b>	40,59815	48,59224	38,65579	33,11768
<b>524,35</b>	40,59815	48,59224	38,65579	33,11768
<b>546,33</b>	13,65765	17,76884	13,54757	11,05284
<b>579,33</b>	114,21991	120,96810	72,13275	61,51298
<b>634,42</b>	18,73153	20,65713	16,58707	12,59362
<b>715,34</b>	91,60019	83,14208	55,26560	39,77712
<b>715,35</b>	91,35144	104,40402	63,27084	47,59965
<b>725,52</b>	30,07015	22,43074	16,99924	10,20013
<b>726,03</b>	0,78045	0,92983	0,97681	0,77200
<b>757,79</b>	3,15726	6,81868	3,11289	2,74476
<b>779,36</b>	49,10189	55,35142	21,48207	14,55070
<b>786,57</b>	53,05379	44,07445	30,63902	18,46899
<b>786,59</b>	49,87617	64,37091	39,24879	33,37367
<b>808,57</b>	60,03832	69,48353	42,66394	37,32197
<b>880,73</b>	13,83405	15,25988	7,16108	5,13246
<b>880,75</b>	9,13155	16,57604	6,80637	6,48525
<b>903,72</b>	10,28556	11,33762	5,38103	2,96819



A pesar de que todas las soluciones generaron un espectro similar, el uso de una menor ratio de agua en la solución ACN/H<sub>2</sub>O (60:40 y 70:30) permitió identificar un número de picos específicos del rango  $m/z$  800-1200 que no se detectaron en el resto de las soluciones empleadas. Asimismo, la cuantificación de los picos más prevalentes en cada espectro reveló una proporcionalidad inversa entre la concentración de acetonitrilo y la intensidad de señal detectada, obteniéndose los mejores resultados de identificación en el ratio 50:50 (ACN/H<sub>2</sub>O).

#### ▪ ANÁLISIS

Por último, las muestras fueron introducidas en el MALDI para su análisis posterior. Dicho análisis permitió la identificación de los valores de masa/carga ( $m/z$ ) de las moléculas presentes en la muestra, así como su localización (zonación) dentro del tejido. Sin embargo, para poder anotar dichas  $m/z$  pueden utilizarse bases de datos (i.e., LIPID MAPS, <https://www.lipidmaps.org/>) o la aplicación de técnicas complementarias que permitan asignar dichos valores a lípidos concretos utilizando calibrantes internos. En este sentido, y debido a las limitaciones en las anotaciones encontradas en dichas bases de datos y, especialmente, en el poder de resolución del equipo utilizado para MALDI-IMS, se utilizó LC-QqQ MS/MS como aproximación complementaria para establecer el perfil lipídico preciso del tejido adiposo, utilizando las mismas muestras a las empleadas para los estudios de MALDI-IMS.

En concreto, para los estudios de lipidómica se tomaron como referencia los protocolos descritos en la literatura, probándose diversas estrategias para la extracción óptima de lípidos en muestras de tejido adiposo. En primer lugar, se probaron dos tipos de extractantes con propiedades distintas (MTBE: metil tert-butil éter y CM: cloroformo/metanol, 1:1) así como el uso de un protocolo de extracción sólida (SPE) con el fin de maximizar la identificación de lípidos. Los resultados obtenidos, que se recogen en el artículo realizado al inicio del desarrollo de esta Tesis en colaboración con el grupo del Dr. Feliciano Priego (Grupo GC-21, IMIBIC) mostraron que cada familia de lípidos estaba influenciada de distinta forma en función del extractante utilizado (López-Bascón et al., 2018).

Por un lado, el uso de MTBE proporcionó un total de 94 identificaciones a partir de muestras de tejido adiposo humano visceral, mostrando una eficiencia óptima en la extracción de ácidos grasos insaturados, glicerofosfolípidos y ceramidas. Por su parte, la mezcla CM permitió la identificación de un total de 89 especies lipídicas, favoreciendo el aislamiento de ácidos grasos saturados y plasmalógenos. Vistas estas restricciones de identificación dependientes del método de extracción, realizamos una revisión de la literatura en búsqueda de métodos de extracción de lípidos más generales, eficaces para mezclas complejas de lípidos, como sucede en el tejido adiposo, que apoyaban el uso de la mezcla CM en proporción 2:1 (Lee D. Roberts et al., 2014). Aplicamos por tanto este procedimiento, realizando un proceso de extracción doble de las muestras (detallado en la Sección de Material y Métodos), lo que, en combinación con una aproximación de LC-QqQ MS/MS, permitió la identificación de 254 lípidos distintos, tanto en tejido adiposo humano como de rata. Estos datos permitieron ampliar y validar la bases de datos generada previamente por nosotros del tejido adiposo (López-Bascón et al., 2018), constituyendo la base de datos definitiva empleada como referencia para la anotación lipídica de los valores  $m/z$  obtenidos mediante los estudios de MALDI-IMS.

#### 4.2.- Análisis del perfil lipídico del tejido adiposo en modelos de obesidad y resistencia a insulina.

##### 4.2.1.- Generación y validación del modelo animal de obesidad.

Con el fin de poder analizar el perfil lipídico del tejido adiposo mediante el uso de la técnica MALDI-IMS, se emplearon en primer lugar muestras de tejido adiposo procedentes de un modelo murino de obesidad mórbida, generado por el grupo del Dr. Manuel Tena-Sempere (Grupo GC10, IMIBIC) (Novelle et al., 2017; Sánchez-Garrido et al., 2015). En concreto, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, que fueron sometidas a una combinación de dos estímulos obesogénicos con efectos aditivos sobre el peso corporal: sobrenutrición postnatal por reducción de la camada (*small litter*, SL) y alimentación con dieta alta en grasas (*high-fat diet*, HFD) desde el destete (día 21) hasta su sacrificio (día 175). Por otra parte, el grupo control estaba compuesto por ratas macho de la misma cepa, pero criadas en una camada normal (*normal litter*, NL) y alimentadas con una dieta baja en grasas (*low-fat diet*, LFD) durante los mismos días que el grupo anterior.

En consonancia con lo descrito previamente, el consumo de una dieta rica en grasa unido a la reducción de la camada, permitieron un rápido incremento del peso corporal desde los primeros días de destete de los animales, alcanzando un aumento significativo en la edad adulta (Fig.26A). Una vez finalizada la intervención dietética y antes de proceder a su sacrificio, las ratas del grupo SL/HFD mostraron un incremento significativo del peso corporal, siendo éste un 17,2% mayor con respecto al grupo NL/LFD (Fig.26A). También incrementó el porcentaje de grasa corporal pasando de ser el 12,46% en el grupo NL/LFD a alcanzar el 20,36% (Fig.26B), representando así un incremento del 63,34% tras el tratamiento dietético. Además, se analizó la homeostasis glucídica de estos animales mediante los ensayos clásicos de prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) y prueba de tolerancia a la insulina (ITT). Ambas pruebas mostraron un desequilibrio en los niveles de glucosa basales, generando una pérdida de asimilación de glucosa por parte de los tejidos (Fig.26C) así como una mayor resistencia a la insulina en el grupo SL/HF tras 25 semanas de intervención dietética (Fig.26D).

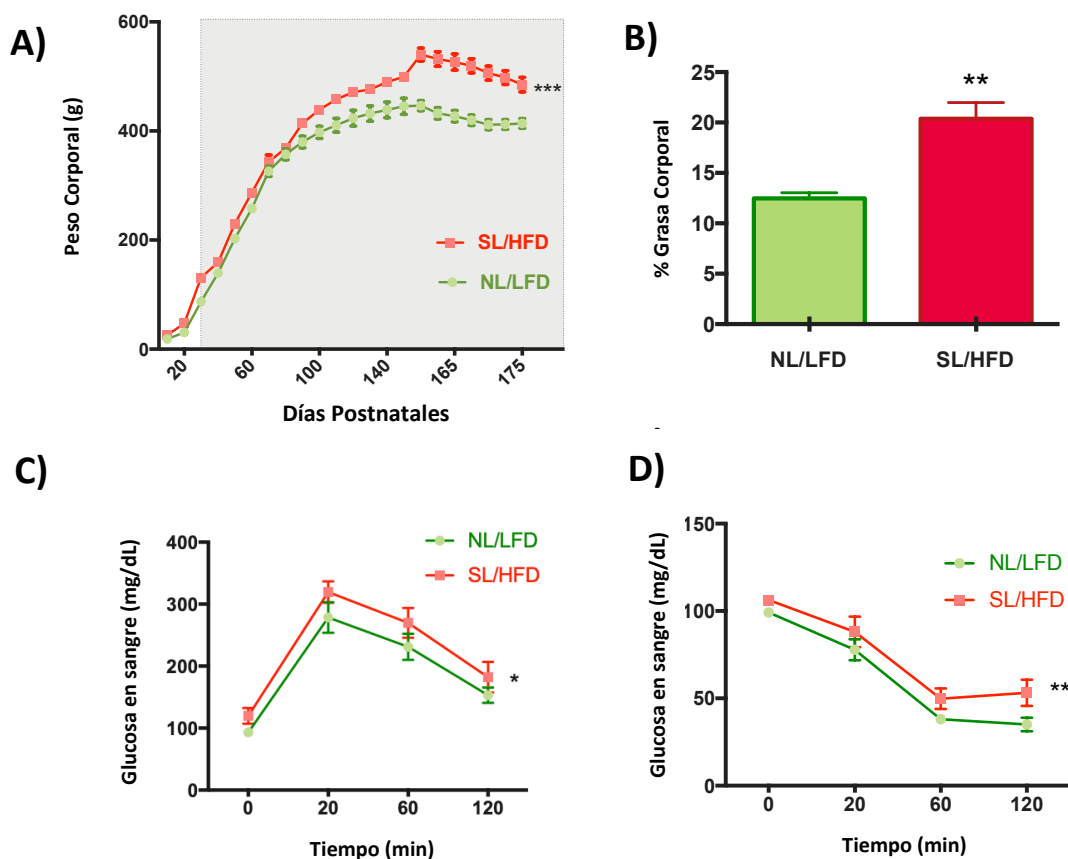
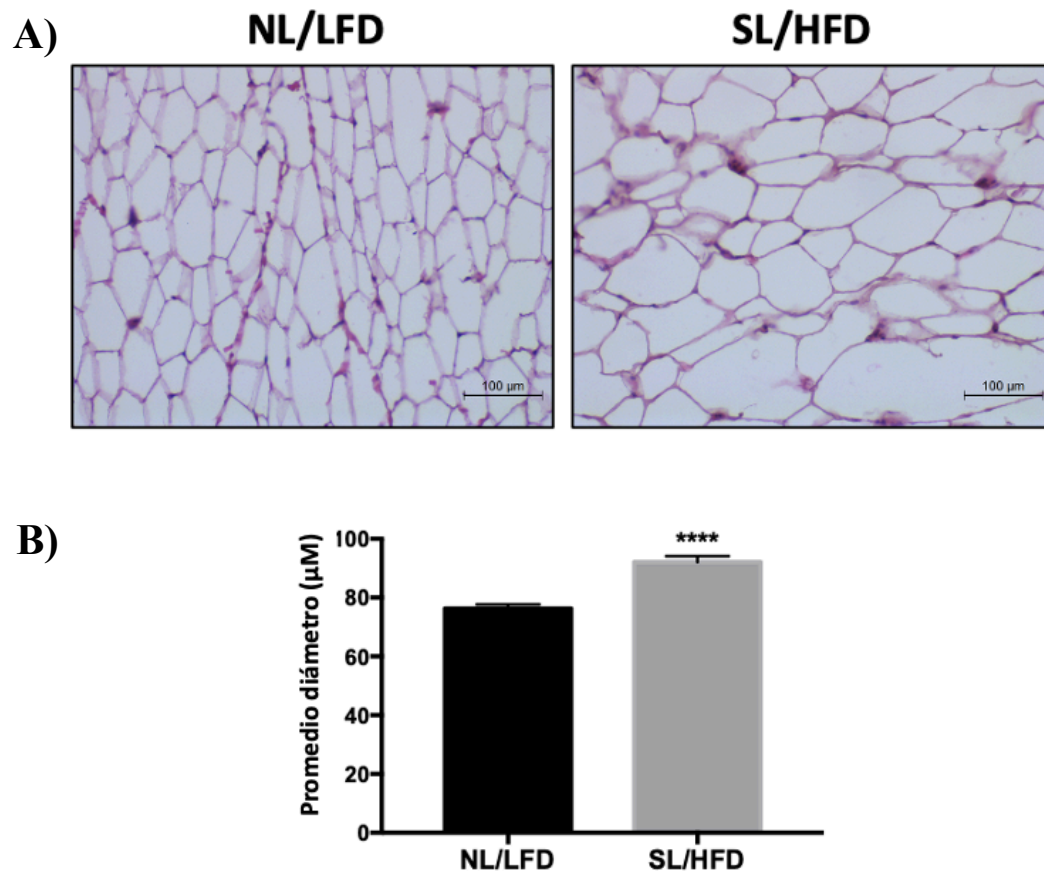


Figura 26. Efecto de la sobrenutrición neonatal y el consumo de dieta alta en grasa sobre la glucemia y los parámetros bioquímicos. (A) Evolución del peso corporal medio de las ratas desde el destete (Día 21) hasta el día de sacrificio (Día 175); SL/HFD: camada pequeña (SL, *small litter*), dieta alta en grasas (HFD); NL/HFD: camada normal (NL, *normal litter*), dieta baja en grasa (LFD);  $n=3$  por cada grupo. La región sombreada corresponde a la ventana de intervención dietética con LFD o HFD. (B) Porcentaje de masa grasa en ratas macho que recibieron dieta control (LFD) frente a las alimentadas con dieta alta en grasa (HFD) para inducir obesidad. La determinación de la grasa corporal se hizo por duplicado en cada animal mediante resonancia magnética nuclear. (C) Evaluación de los niveles de glucosa en sangre tras la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT,  $n=6$  por grupo). (D) Análisis de la prueba de tolerancia a la insulina (ITT) donde se representan los niveles promedio de glucosa con relación a los niveles iniciales de glucosa en ambos grupos experimentales ( $n=6$  por grupo). Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$  con respecto al grupo NL/LFD).

Con el fin de investigar si el mayor porcentaje de grasa corporal se debió a una mayor expansión del tejido adiposo, se analizó el tamaño de los adipocitos en ambos grupos experimentales en cortes histológicos. Así, se observó como la mayor parte del tejido adiposo estaba constituido por adipocitos uniloculares en ambos grupos experimentales (Fig.27A). Finalmente, el análisis comparativo del tamaño de los adipocitos reveló diferencias significativas entre los dos grupos de estudio, ya que el grupo NL/LFD presentaba un diámetro medio de 76,3  $\mu\text{M}$  mientras que el grupo SL/HFD, alcanzó una media de 92,1  $\mu\text{M}$  (Fig.27B)



**Figura 27. Expansión del tejido adiposo en respuesta a las sobrenutrición postnatal y la alimentación rica en grasas.** (A) Imágenes representativas que ilustran la morfología de los adipocitos (secciones teñidas con hematoxilina y eosina) de ratas macho criadas en camadas normales (NL) o camadas pequeñas (SL) y alimentadas con una dieta baja en grasa (LFD) o alta en grasa (HFD). (B) Cuantificación del tamaño de los adipocitos (> 300 células por foto) en regiones aleatorias del tejido adiposo (n=3 por grupo). Los gráficos de barras representan la media aritmética  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

Estos resultados validan la utilidad del modelo animal para el estudio de la obesidad y la resistencia a insulina ya que la acumulación masiva de lípidos en el tejido adiposo produjo tanto un significativo aumento del peso corporal como una desregulación de la homeostasis glucídica, tal y como revelaron las pruebas GTT e ITT.

#### 4.2.2.- Identificación del perfil lipídico mediante MALDI-IMS

Una vez generado y validado el modelo de obesidad, se procedió a analizar el perfil lipídico en el tejido adiposo de ambos grupos experimentales y su distribución en respuesta a obesidad. Para llevarlo a cabo se utilizó el protocolo previamente optimizado para el análisis de tejidos grasos mediante MALDI-IMS. Las muestras fueron procesadas conforme a la descripción del bloque anterior y posteriormente procesadas en el espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 5800 (AB SCIEX, USA) de la Unidad Central de Apoyo a la Investigación de Proteómica del IMIBIC.

La exploración inicial de las secciones de tejido adiposo por MALDI-IMS reveló un total de 33.334 valores  $m/z$ , de los cuales sólo permanecieron un total de 5000 valores  $m/z$  tras aplicar un filtrado por aplicación del rango intercuartílico (IQR). Esta estimación estadística se utiliza con frecuencia para reducir la presencia de *outliers* y eliminar sesgos de interpretación en etapas posteriores ya que se trata de una medida de la dispersión correspondiente a una distribución de datos (Hackstadt & Hess, 2009). Una vez aplicada una prueba  $t$  de Student para muestras independientes, se obtuvo un total de 953 iones significativos, de los cuales 625 estaban disminuidos y 328 aumentados en el grupo de ratas obesas (SL/HFD) con respecto al grupo control (NL/LFD) (Fig.28).

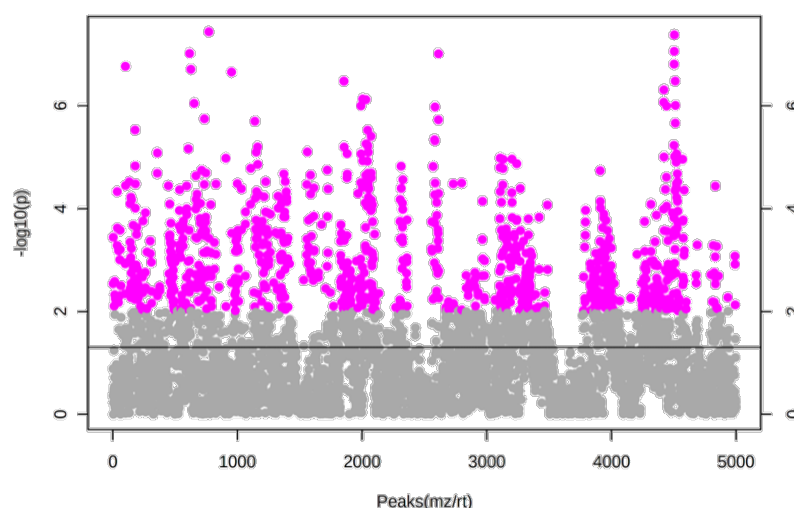
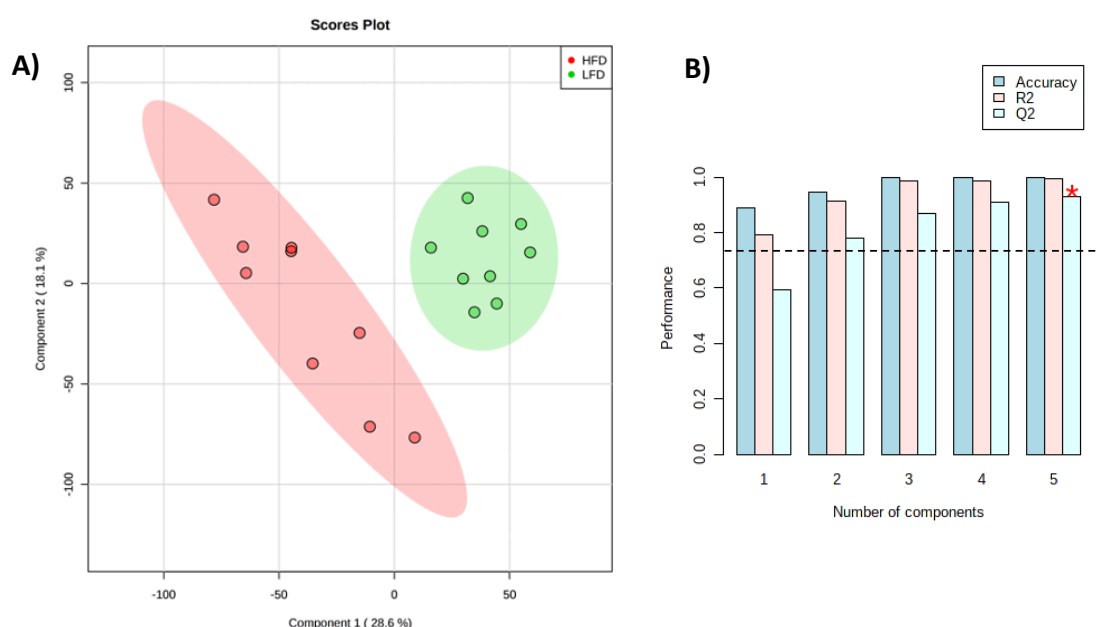


Figura 28. Análisis estadístico sobre el número de iones detectados de manera diferencial en el modelo animal de obesidad inducida por dieta y tamaño de camada. Los círculos en rosa representan los iones significativos con respecto al total de iones no significativos (gris) cuando se comparan ambos grupos experimentales (prueba  $t$  de Student,  $p < 0.05$ ).

Por otra parte, se llevó a cabo un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Este método estadístico de validación cruzada permite predecir la pertenencia de cada muestra a su grupo experimental en función de su huella lipídica. Así, la representación gráfica del modelo PLS-DA, mostró una clara separación entre el grupo de ratas control (LFD, verde) y el grupo de ratas obesas (HFD, rojo) (Fig.29A).

Paralelamente, se hizo una evaluación del rendimiento de las predicciones generadas por el modelo sobre la base del número de componentes seleccionados. Esta evaluación te permite conocer el potencial de predicción del modelo en base a dos coeficientes matemáticos: el valor predictivo ( $Q^2$ ) y el coeficiente de determinación de la regresión ( $R^2$ ). En base a lo descrito previamente (Hair et al., 2012; Henseler et al., 2009), se estima que para que modelo tenga una buena capacidad de predicción, ambos coeficientes tienen que situarse por encima de 0,75 (rango 0-1). Tal y como se muestra en la (Fig.29B), todos los parámetros de evaluación se situaron por encima del umbral citado previamente a partir del uso de dos componentes, lo cual significa que el modelo generado es altamente predictivo. En concreto, se obtuvo un valor  $Q^2$  del 0,77922 y un valor  $R^2$  de 0.91362.



**Figura 29. Análisis multivariante del perfil lipídico en modelos de obesidad.** (A) Modelo de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), creado para predecir la pertenencia de cada muestra a su grupo experimental en función de su firma lipídica. El porcentaje de variabilidad explicado para cada componente se muestra entre paréntesis en el eje correspondiente. (B) Evaluación del

rendimiento de las predicciones generadas por el modelo atendiendo al número de componentes seleccionados. La línea negra discontinua fija el umbral para definir un modelo con alta capacidad de predicción. LFD: ratas criadas en camada normal y alimentadas con una dieta baja en grasas, HFD: ratas criadas en camada pequeña y alimentadas con una dieta alta en grasas.

Asimismo, la representación heatmap de los 75 iones más significativos entre ambos grupos (prueba *t* de Student,  $p < 0.05$ ) confirmó la tendencia mayoritaria a la disminución de iones, evidenciando la modificación del perfil del tejido adiposo en respuesta a los cambios inducidos por el modelo de obesidad (Fig.30).

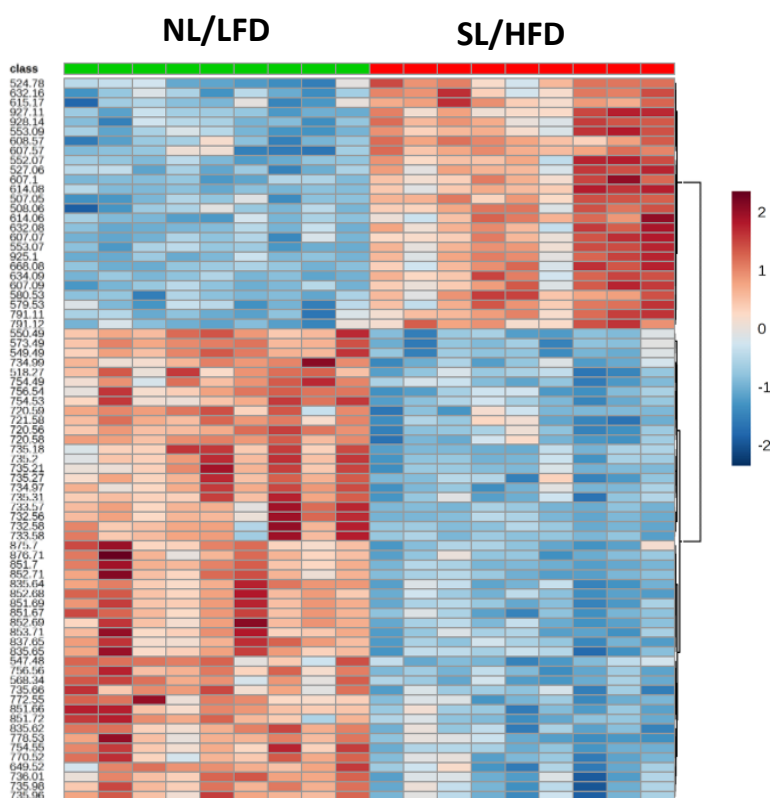


Figura 30. Análisis *heatmap* del perfil lipídico en modelos de obesidad. (A) Representación gráfica (heatmap) de los 75 iones más significativos (prueba *t* de Student) que se han detectado en el análisis de ambos grupos experimentales. La escala de -2(azul) a 2(rojo) representa la abundancia normalizada en unidades arbitrarias. NL/LFD: ratas criadas en camada normal y alimentadas con dieta baja en grasa; SL/HFD: ratas criadas en camada pequeña y alimentadas con una dieta alta en grasa.

Estos resultados señalan en su conjunto, la presencia de un marcado perfil de iones con expresión diferencial entre el grupo control (NL/LFD) y el grupo de ratas obesas (SL/HFD), y a su vez ponen de manifiesto que la técnica es válida para separar ambos grupos experimentales de acuerdo con la distribución de su perfil lipídico específico.



#### 4.2.3.- Análisis lipidómico dirigido por LC-QqQ MS/MS.

Como complemento al análisis del tejido adiposo por MALDI Imaging, se llevó a cabo un estudio de muestras de tejido adiposo de los modelos animales descritos en apartados anteriores, NL/LFD y SL/HFD, mediante lipidómica dirigida (LC-QqQ MS/MS). En este análisis, nos centramos en el estudio de los lípidos presentes en las membranas celulares y excluimos los lípidos neutros (mono-, di- y triacilglicéridos) ya que éstos representan las especies más abundantes en el tejido adiposo y ya se han documentado previamente (Grzybek et al., 2019). En primer lugar, el análisis cualitativo de los extractos lipídicos de tejido adiposo permitió la identificación de un total de 254 especies lipídicas diferentes repartidas en 14 clases, compuestas en su mayoría por glicerofosfolípidos, éter-fosfolípidos y esfingolípidos (Fig.31). Con respecto al grupo de glicerofosfolípidos, la familia de las fosfatidilcolinas (PC) y las lisofosfatidilcolinas (LPC) fueron las clases más representadas, constituyendo el 29% y 15%, respectivamente, del total de lípidos identificados. Por su parte, dentro del grupo de éter-fosfolípidos, destaca la presencia mayoritaria de alquilfosfatidilcolinas (PC-Os) y alquenilfosfatidilcolinas (PC-Ps), con una representación del 8% y 5% con respecto al total de identificaciones. En ultimo lugar, el grupo de esfingolípidos estaba compuesto principalmente por identificaciones relativas a esfingomielinas (SM) y ceramidas (CER), con una representación del 9% y 6% respectivamente.

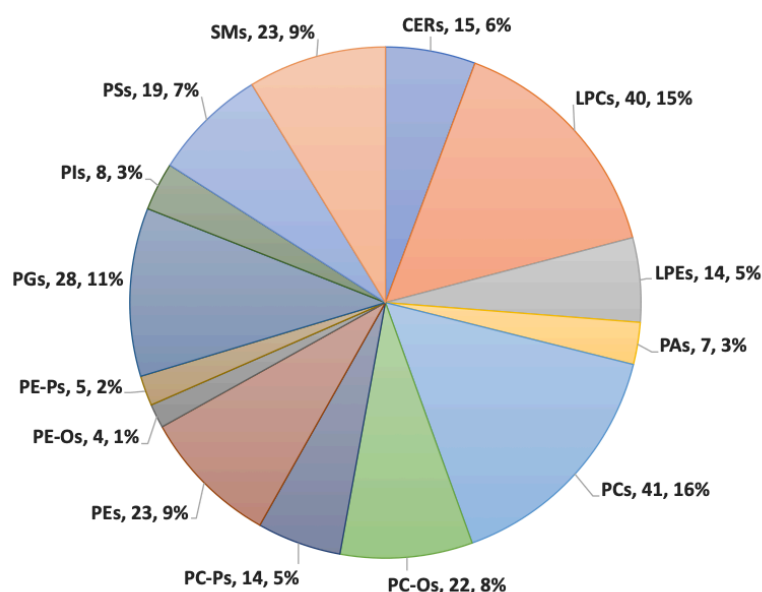
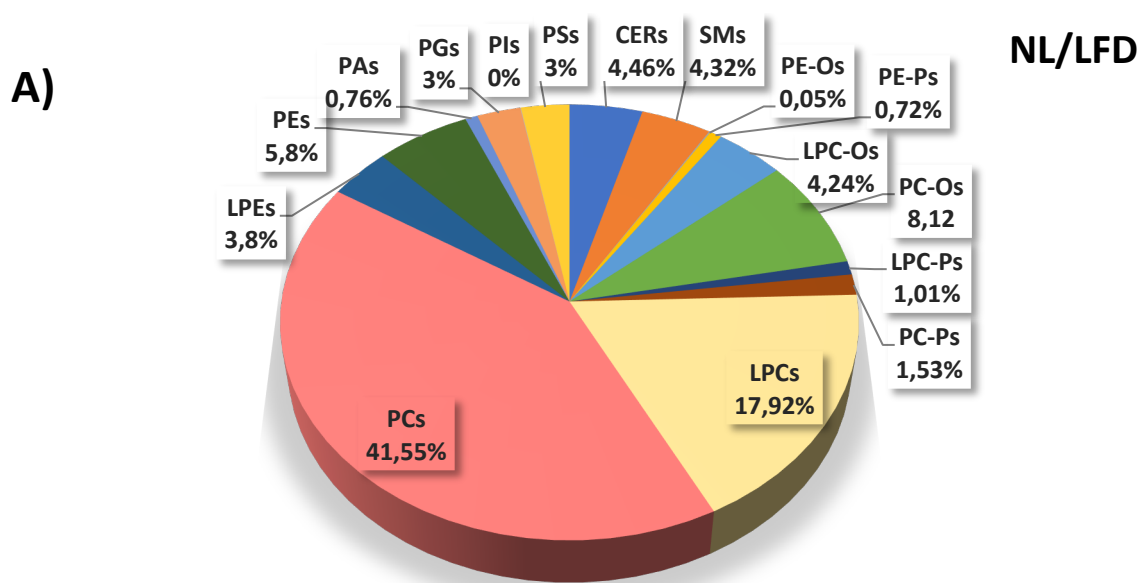


Figura 31. Distribución de las familias lipídicas identificadas por análisis lipidómico dirigido (LC-MS/MS) en modelos animales de obesidad inducida por dieta. Gráfico circular que muestra la proporción de cada

compuesto identificado en ambos grupos experimentales y agrupados por familia de lípidos a la que pertenece. CER: ceramidas; LPC: lisofosfatidilcolinas; LPE: lisofosfatidiletanolaminas; PA: ácido fosfatídico; PC: fosfatidilcolinas; PC-Os: alquilfosfatidilcolinas; PC-Ps: alquenilfosfatidilcolinas; PE: fosfatidiletanolaminas; PE-Os: alquilfosfatidiletanolaminas; PE-Ps: alquenilfosfatidiletanolaminas; PG: fosfatidilglicerol; IP: fosfatidilinositoles; PS: fosfatidilserinas; SM: esfingomielinas.

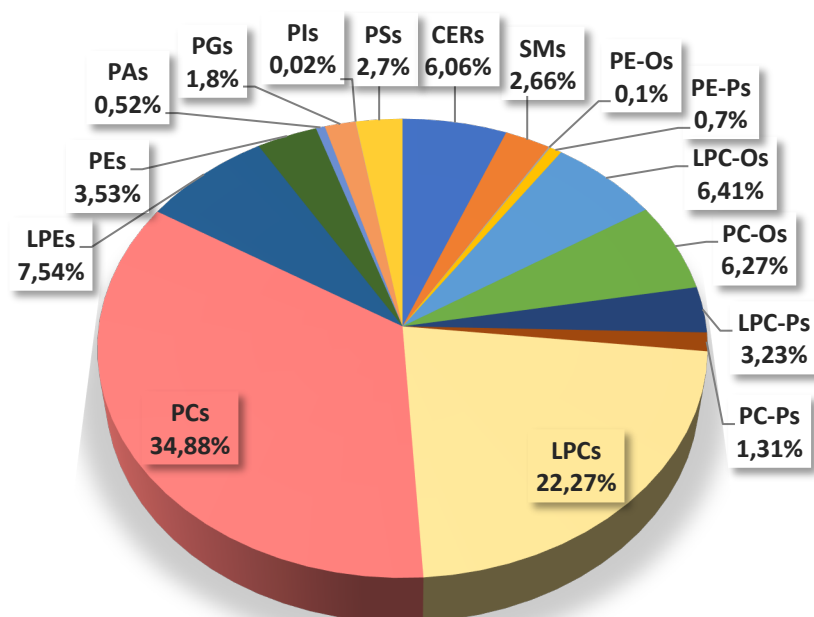
En segundo lugar, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de los extractos lipídicos con el fin de estudiar el perfil de distribución lipídica en muestras de tejido adiposo de las ratas control (NL/LFD) y las ratas obesas (SL/HFD). Los resultados obtenidos mostraron importantes diferencias en la composición del lipidoma asociado a cada grupo de estudio (Fig.32A). Por un lado, se observó un incremento en la concentración total de lípidos mostrando un aumento del 34,95% en el grupo SL/HFD con respecto al grupo NL/LFD (Fig.32B).

Posteriormente, un análisis más detallado de las diferentes familias de lípidos mostró un aumento generalizado de lisofosfolípidos y éter-fosfolípidos, siendo significativo en las clases alquenil lisofosfatidilcolina (LPC-Ps, +330,68%,  $p = 0,0276$ .) y alquenil fosfatidilcolinas (PC-Ps, +15,51%,  $p = 0,0256$ ). No obstante, también se detectó un descenso, aunque no significativo, en la concentración de fosfoinositoles (PIs, -36,76%), fosfatidiletanolaminas (PEs, -17,73%) y esfingomielinas (SMs, -16,99%).



B)

SL/HFD



C)

	LFD	SEM	HFD	SEM	HFD/LFD	P-valor
<b>CERs</b>	1.275.567,50	315.783,26	2.338.295,50	276.569,96	83,31% ↑	0,1299
<b>SMs</b>	1.235.531,50	112.041,54	1.025.639,00	133.209,42	-16,99% ↓	0,4387
<b>PE-Os</b>	26.450,00	12.868,68	38.740,68	6.093,49	46,47% ↑	0,4559
<b>PE-Ps</b>	205.086,00	21.894,07	271.837,50	19.008,42	32,55% ↑	0,1303
<b>LPC-Os</b>	1.211.728,60	176.667,63	2.470.696,50	293.115,69	103,90% ↑	0,1090
<b>PC-Os</b>	2.320.350,00	123.008,82	2.416.701,82	163.343,48	4,15% ↑	0,7572
<b>LPC-Ps</b>	288.963,80	10.708,70	1.244.495,50	162.676,50	330,68% ↑	<b>0,0276</b>
<b>PC-Ps</b>	437.040,50	11.975,39	504.836,50	11.657,91	15,51% ↑	<b>0,0256</b>
<b>LPCs</b>	5.121.967,30	1.143.867,58	8.588.087,50	1.037.752,95	67,67% ↑	0,2110
<b>PCs</b>	11.875.092,50	564.527,37	13.453.102,50	995.290,11	13,29% ↑	0,2316
<b>LPEs</b>	1.085.021,10	189.206,20	2.906.754,00	334.450,80	167,90% ↑	0,0584
<b>PEs</b>	1.656.919,50	190.138,36	1.363.096,50	138.881,11	-17,73% ↓	0,3834
<b>PAs</b>	217.839,50	18.229,72	202.310,72	14.831,86	-7,13% ↓	0,3048
<b>PGs</b>	762.554,50	64.209,91	693.205,00	77.154,62	-9,09% ↓	0,5955
<b>PIs</b>	10.838,00	1.453,67	6.854,00	919,06	-36,76% ↓	0,7114
<b>PSs</b>	847.111,50	61.350,14	1.040.036,50	89.696,77	22,77% ↑	0,0732
<b>Total</b>	<b>28.578.061,80</b>		<b>38.564.689,72</b>		<b>34,95% ↑</b>	0,3246

Figura 32. Análisis cuantitativo del perfil lipídico en modelos animales de obesidad inducida por dieta. Los extractos lipídicos de tejido adiposo procedente de ratas control NL/LFD y ratas obesas SL/HFD fueron identificados mediante un análisis lipidómico dirigido (LC-QqQ MS/MS). En cada gráfico de sectores se representa la distribución relativa de cada familia de lípidos tanto en (A) ratas control NL/LFD, como en (B), ratas obesas SL/HFD. C) Distribución estadística de frecuencias cuantitativas para cada familia de lípidos

detectada y por cada grupo de estudio al que pertenece. Las familias se distribuyeron a su vez en esfingolípidos (CERs y SMs), éter-fosfolípidos (PE-Os, PE-Ps, LPC-Os, PC-Os, LPC-Ps, PC-Ps) y demás glicerofosfolípidos (LPCs, PCs, LPEs, PEs, PAs, PGs, Pls y PSs). *CERs: ceramidas; SMs: esfingomielinas; PE-Os: alquil fosfatidiletanolaminas; PE-Ps: alquenil fosfatidiletanolaminas; LPC-Os: alquil lisofosfatidilcolinas; PC-Os: alquil fosfatidilcolinas; LPC-Ps: alquenil lisofosfatidilcolinas; PC-Ps: alquenil fosfatidilcolinas; LPCs: lisofosfatidilcolinas; PCs: fosfatidilcolinas; LPEs: lisofosfatidiletanolaminas; PEs: fosfatidiletanolaminas; PAs: ácido fosfatídico; PGs: fosfatidilglicerol; Pls: fosfatidilinositol y PSs: fosfatidilserinas.*

En tercer lugar, la anotación de lípidos se llevó a cabo gracias a la integración de los resultados obtenidos sobre cortes de tejido mediante MALDI-IMS y los obtenidos a partir de los extractos lipídicos mediante LC-QqQ MS/MS, usando para ellos las mismas muestras de tejido adiposo. De esta forma, sobre la base de los valores  $m/z$  detectados por MALDI-TOF ([Tabla 5, columna C](#)), se calculó la  $m/z$  neutra para cada uno de los posibles aductos de formación ([Tabla 5, columna B](#)) y posteriormente, estos se compararon con los valores de  $m/z$  neutra obtenida en los experimentos de LC-QqQ MS/MS ([Tabla 5, columna A](#)). A continuación, se seleccionaron aquellas identificaciones con un delta inferior a 0.005 para su uso en etapas posteriores del análisis. Con la aplicación de este procedimiento, se identificaron un total de 44 especies lipídicas, la mayoría de las cuales estaban disminuidas en el grupo de ratas obesas SL/HFD en comparación con las ratas control NL/LFD ([Tabla 5](#)). Por otro lado, las esfingomielinas SM(d18:0\_18:2) y SM(d18:0\_17:0) constituyeron las formas lipídicas cuyo aumento fue más pronunciado en el grupo de ratas obesas. En contrapartida, las esfingomielinas SM(d18:2\_24:0) y SM(d18:1\_24:0) junto a la fosfatidilcolina PC(18:1\_22:2) y los éter-fosfolípidos PE(P-16:0\_20:0), PE(P-16:0\_20:0) y PE(P-18:1\_22:6), fueron los lípidos que experimentaron un mayor descenso en el grupo SL/HFD con respecto al grupo control.

Tabla 5. Listado de iones detectados mediante la técnica MALDI-IMS y posteriormente identificados como lípidos mediante LC-QqQ MS/MS en secciones de tejido adiposo de ratas delgadas frente a ratas obesas.

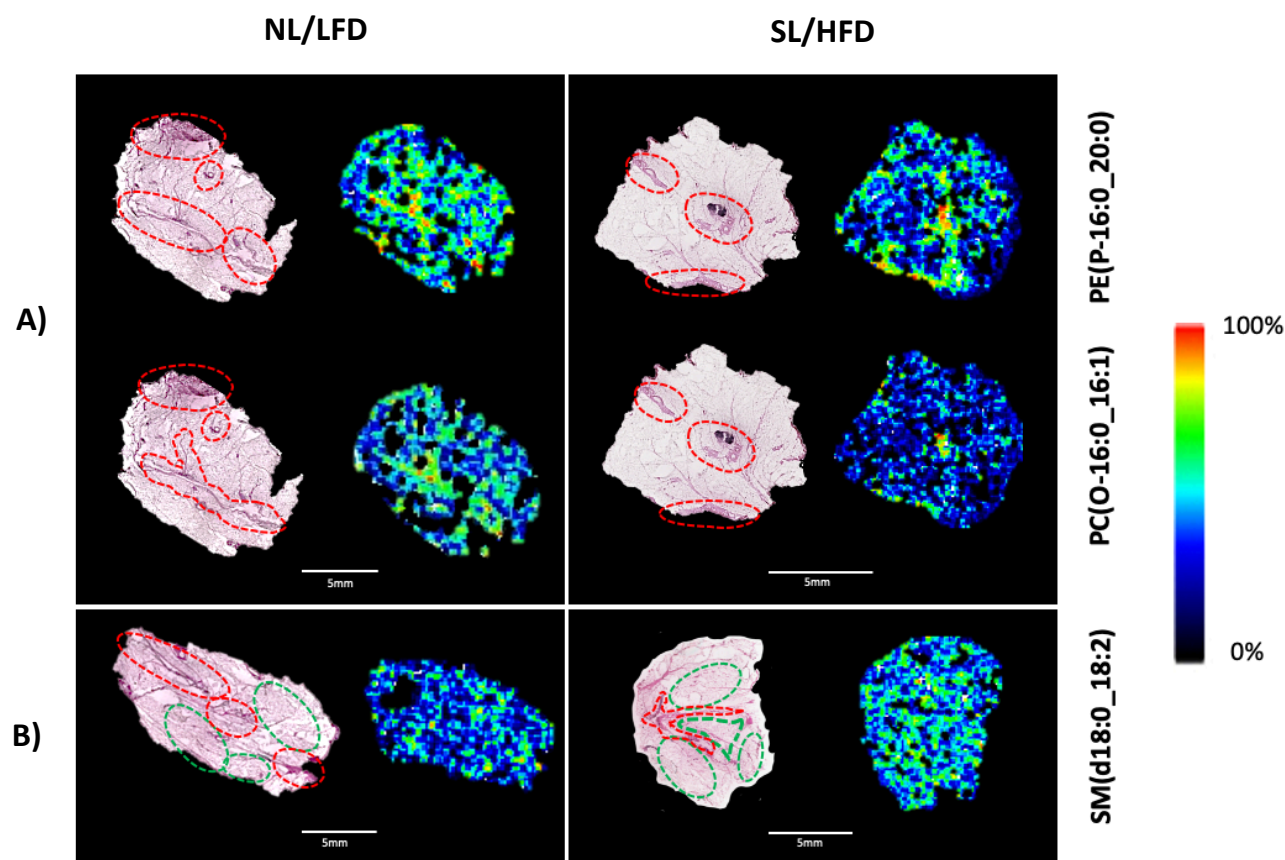
ID	m/z Product Ion	RT	a)	b)	c)	Adduct	Delta	Fold Change (FC)	log2 (FC)
LPC (22:6)	327.23	3.54	567.33	567.33	568.34	[M+H] <sup>+</sup>	0.000	0.529	-0.91867
PC (16:0_16:0)	255.23	14.65	733.56	733.56	734.57	[M+H] <sup>+</sup>	-0.001	0.59299	-0.75393
PC (18:1_20:5)	255.24	14.98	805.56	805.56	806.57	[M+H] <sup>+</sup>	-0.001	0.57037	-0.81004
PC (18:2_16:0)	255.23	15.24	757.56	757.56	758.57	[M+H] <sup>+</sup>	-0.001	0.64705	-0.62804
PC (20:4_16:0)	303.23	14.98	781.56	781.56	782.57	[M+H] <sup>+</sup>	-0.001	0.65941	-0.60074
PE (18:0_20:0)	283.26	15.59	775.61	775.61	776.62	[M+H] <sup>+</sup>	-0.004	0.69963	-0.51535
PG (18:0_18:2)	283.26	17.15	774.54	774.54	775.55	[M+H] <sup>+</sup>	-0.002	0.65646	-0.60722
PG (18:0_22:6)	283.26	16.23	822.54	822.54	823.55	[M+H] <sup>+</sup>	-0.002	0.51775	-0.94966
PC (O-16:0_16:1)	255.23	16.47	717.56	717.56	718.57	[M+H] <sup>+</sup>	-0.001	0.61966	-0.69044
PE (P-16:0_20:0)	255.23	15.23	731.58	731.58	732.59	[M+H] <sup>+</sup>	0.000	0.47879	-10.625
SM (d18:0_18:2)	279.23	15.86	728.58	728.58	729.59	[M+H] <sup>+</sup>	0.000	1.619	0.69508
LPC (16:0)	255.23	4.33	495.33	495.33	518.32	[M+Na] <sup>+</sup>	0.002	0.40361	-1.309
LPC (18:2)	279.23	4.16	519.33	519.33	542.32	[M+Na] <sup>+</sup>	0.002	0.5172	-0.95121
LPC (20:3)	305.25	4.6	545.35	545.35	568.34	[M+Na] <sup>+</sup>	-0.002	0.529	-0.91867
PC (16:0_18:1)	281.25	15.05	759.58	759.58	782.57	[M+Na] <sup>+</sup>	-0.002	0.65941	-0.60074
PC (18:0_16:0)	283.26	15.95	761.59	761.59	784.58	[M+Na] <sup>+</sup>	0.004	0.62482	-0.67848
PC (18:0_20:5)	301.21	15.43	807.58	807.58	830.57	[M+Na] <sup>+</sup>	-0.002	0.54912	-0.86481
PC (18:1_18:1)	279.24	16.34	785.59	785.59	808.58	[M+Na] <sup>+</sup>	0.003	0.63575	-0.65347
PE (16:0_20:4)	255.23	15.23	739.52	739.52	762.51	[M+Na] <sup>+</sup>	-0.005	0.58473	-0.77415
PE (16:1_18:1)	281.24	15.25	715.52	715.52	738.51	[M+Na] <sup>+</sup>	-0.005	0.59535	-0.7482
PE (16:1_18:2)	279.23	14.5	713.50	713.50	736.49	[M+Na] <sup>+</sup>	-0.001	0.50628	-0.98199
PE (18:0_20:1)	283.26	16.53	773.59	773.59	796.58	[M+Na] <sup>+</sup>	0.003	0.73672	-0.44082
PG (18:0_18:1)	281.24	15.11	776.56	776.56	799.55	[M+Na] <sup>+</sup>	-0.004	0.55703	-0.84417
PE (O-16:0_22:5)	255.23	14.85	751.55	751.55	774.54	[M+Na] <sup>+</sup>	0.001	0.60267	-0.73055
PE (P-16:0_20:0)	255.23	15.23	731.58	731.58	754.57	[M+Na] <sup>+</sup>	0.003	0.49521	-10.139
PE (P-18:1_22:6)	281.24	16.63	773.54	773.54	796.53	[M+Na] <sup>+</sup>	-0.004	0.47372	-10.779
SM (d18:1_20:0)	281.24	14.95	758.63	758.63	781.62	[M+Na] <sup>+</sup>	0.000	0.61506	-0.70119
SM (d18:1_24:0)	281.24	13.6	814.69	814.69	837.68	[M+Na] <sup>+</sup>	0.003	0.49082	-10.267
SM (d18:2_24:0)	279.23	16.28	812.68	812.68	835.67	[M+Na] <sup>+</sup>	-0.003	0.45652	-11.312
PA (22:6_18:1)	281.24	14.91	746.49	746.49	785.59	[M+K] <sup>+</sup>	-0.003	0.64714	-0.62785
PC (18:0_18:0)	283.26	16.65	789.62	789.62	828.72	[M+K] <sup>+</sup>	0.003	0.52558	-0.92801
PC (18:0_18:1)	281.25	16.99	787.61	787.61	826.71	[M+K] <sup>+</sup>	-0.003	0.56912	-0.8132
PC (18:1_22:2)	281.24	13.63	839.64	839.64	878.74	[M+K] <sup>+</sup>	-0.001	0.4784	-10.637
PC (18:2_20:0)	279.23	17.09	813.62	813.62	852.72	[M+K] <sup>+</sup>	0.003	0.357	-1.486
PE (18:1_20:4)	303.23	15.82	765.53	765.53	804.63	[M+K] <sup>+</sup>	-0.001	0.65603	-0.60817
PG (16:0_16:1)	255.23	15.94	720.49	720.49	759.59	[M+K] <sup>+</sup>	0.002	0.61048	-0.71198

<b>PC (P-16:0_20:5)</b>	301.25	14.81	763.55	763.55	802.65	<b>[M+K]<sup>+</sup></b>	0.000	0.72622	-0.46151
<b>SM (d18:0_17:0)</b>	283.26	15.13	718.60	718.60	757.70	<b>[M+K]<sup>+</sup></b>	-0.003	17.666	0.82101
<b>PA (20:3_18:0)</b>	283.26	14.9	726.52	726.52	744.56	<b>[M+NH4]<sup>+</sup></b>	-0.004	0.65923	-0.60116
<b>PC (18:1_20:5)</b>	255.235	14.98	805.56	805.56	823.60	<b>[M+NH4]<sup>+</sup></b>	-0.002	0.6855	-0.54477
<b>PC (20:4_16:0)</b>	303.23	14.98	781.56	781.56	799.60	<b>[M+NH4]<sup>+</sup></b>	-0.002	0.62358	-0.68135
<b>PC (22:6_18:0)</b>	327.23	15.81	833.59	833.59	851.63	<b>[M+NH4]<sup>+</sup></b>	-0.001	0.50925	-0.97355
<b>PG (18:0_18:2)</b>	283.26	17.15	774.54	774.54	792.58	<b>[M+NH4]<sup>+</sup></b>	-0.003	0.71704	-0.47988
<b>PS (18:1_20:0)</b>	281.24	16.22	817.58	817.58	835.62	<b>[M+NH4]<sup>+</sup></b>	-0.001	0.51093	-0.96881

(A) m/z neutra detectada por LC-MS/MS, (B) m/z neutra detectada por MALDI-TOF, (C) masa detectada por MALDI-TOF. *LPC*: lisofosfatidilcolinas; *PA*: ácido fosfatídico; *PC*: fosfatidilcolinas; *PC-Os*: alquilfosfatidilcolinas; *PC-Ps*: alquenilfosfatidilcolinas; *PE*: fosfatidiletanolaminas; *PE-Os*: alquilfosfatidiletanolaminas; *PE-Ps*: alquenilfosfatidiletanolaminas; *PG*: fosfatidilglicerol; *PS*: fosfatidilserinas; *SM*: esfingomielinas.

#### 4.2.4.- Análisis del perfil de distribución espacial de lípidos.

Tras completar la identificación de lípidos mediante el análisis lipidómico dirigido (LC-QqQ MS/MS), el siguiente objetivo de nuestro estudio era caracterizar la distribución de estos lípidos mediante el uso de la técnica MALDI-IMS. Para ello, se tomaron como referencia los lípidos recogidos en la [Tabla 5](#), puesto que se trata de lípidos expresados de manera diferencial y significativa entre ambos grupos de estudio. Del total de lípidos identificados, se seleccionaron las especies SM(d18:0\_18:2), PE(P-16:0\_20:0) y PC(O-16:0\_16:1) para su visualización sobre cortes histológicos. La selección de estas especies debido a sus coeficientes de *fold change* y a los resultados obtenidos previamente en el análisis cuantitativo del lipidoma de ambos grupos experimentales ([véase Fig.32](#)). Tal y como se muestra en la [Fig.33](#), estas especies lipídicas mostraron un patrón de distribución espacial distinto para cada grupo de estudio. En concreto, PC(O-16:0\_16:1) y PE(P-16:0\_20:0) que están enriquecidos en el grupo NL/LFD frente al grupo SL/HFD y mostraban una clara distribución asociada a la fracción de estroma vascular del tejido adiposo, identificada por la acumulación de colágeno. Por su parte, los niveles de SM(d18:0\_18:2), significativamente elevados en el tejido adiposo de animales obesos (SL/HFD), se concentraron en regiones ocupadas por adipocitos, lo que podría indicar un enriquecimiento de este compuesto lipídico en las membranas de las células maduras del tejido adiposo en respuesta a obesidad.



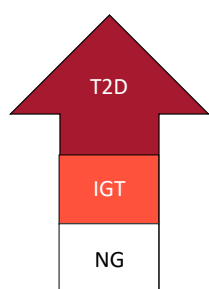
**Figura 33.** Patrones de distribución lipídica en secciones de tejido adiposo analizadas por MALDI-IMS. Las imágenes de cada sección teñida con hematoxilina/eosina se muestran a la izquierda con el objetivo de correlacionar la información histológica y molecular presente en el tejido. (A) Imágenes representativas de los lípidos PC(O-16:0\_16:1) y PE(P-16:0\_20:0), en las que se observa una reducción en la concentración de estos lípidos en el grupo SL/HFD con respecto al grupo control. Esta disminución en ambos lípidos está relacionada a nivel de distribución con la fracción de estroma vascular, enriquecida en los haces de colágeno comprendidos en las áreas fibróticas (líneas discontinuas rojas). (B) Imagen representativa de la esfingomielinina SM(d18:0\_18:2), con niveles más elevados en el grupo SL/HFD con respecto al grupo NL/LFD. En la imagen correspondiente, se observa un enriquecimiento de este lípido en áreas ocupadas mayoritariamente por adipocitos (líneas discontinuas verdes).

Las imágenes mostradas evidencian la utilidad del método para analizar el perfil lipídico de muestras de tejido adiposo sin que se produzca una deslocalización del analito de interés durante la preparación de la muestra. Asimismo, estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de la técnica para profundizar en la caracterización anatomopatológica del tejido adiposo, permitiendo correlacionar la información obtenida por técnicas de tinción en histología con la obtenida en el análisis mediante espectrometría de masas.



#### 4.3.- Análisis lipídico del tejido adiposo en pacientes con obesidad y resistencia a insulina.

Sobre la base de los resultados obtenidos en el estudio con ratas obesas, que se utilizó como modelo para la optimización de la técnica de MALDI-IMS, se planteó como segundo objetivo la caracterización de la huella lipídica asociada al desarrollo de obesidad y resistencia a insulina en tejido adiposo humano utilizando nuestro protocolo optimizado de MALDI-IMS. Concretamente, se emplearon muestras de tejido adiposo de individuos obesos mórbidos normoglucémicos (NG), con niveles elevados de glucosa en ayunas (*impaired fasting glucose*; IFG) y diabéticos tipo 2 (T2D). La clasificación de estos grupos se realizó atendiendo a los criterios de la *American Diabetes Association* (ADA, 2019) (Fig.34).



HbA1c	Glucosa en sangre tras ayuno (mg/dL)	Prueba de tolerancia a glucosa (mg/dL)
≥ 6.5%	≥ 126	≥ 200
5.7-6.5%	100 -126	140 - 200
< 5.7%	< 100	< 140

**Figura 34. Criterios diagnósticos de diabetes y resistencia a insulina.** Clasificación de los individuos de este estudio según las recomendaciones de la *American Diabetes Association* (ADA). La prueba HbA1c mide el nivel promedio de glucosa en sangre durante los últimos tres meses. Por su parte, la prueba de tolerancia a glucosa mide la glucemia plasmática pasadas 2 h desde la sobrecarga oral con glucosa. NG: normoglucémicos; IGT: con intolerancia a la glucosa; T2D: diabéticos tipo 2.

**Tabla 6. Características antropométricas y bioquímicas de los sujetos incluidos en el estudio.**

	NG	IR	T2D
<b>N</b>	5	5	5
<b>Edad (años)</b>	45.8 ± 4.2	42.6 ± 5.1	45.8 ± 9.7
<b>Género (hombres/mujeres)</b>	(1/4)	(2/3)	(3/2)
<b>Peso (Kg)</b>	133.6 ± 15.6	133.0 ± 2.9	167.9 ± 10.8 <sup>bb</sup>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	50.3 ± 3.4	49.1 ± 0.8	55.84 ± 12.5 <sup>b</sup>
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	94.8 ± 4.1	111.0 ± 3.0 <sup>a</sup>	222.5 ± 52.3 <sup>aaa,bbb</sup>
<b>HbA1c (%)</b>	5.3 ± 0.2	6.1 ± 0.1 <sup>aa</sup>	10.1 ± 2.3 <sup>a, bb</sup>
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	134.3 ± 23.9	125.2 ± 10.0	175.0 ± 40.9
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	166.8 ± 10.0	185.0 ± 8.0	201.4 ± 43.3
<b>HDL (mg/dL)</b>	47.5 ± 4.9	47.8 ± 5.0	37.4 ± 8.1
<b>LDL (mg/dL)</b>	96.3 ± 3.2	131.2 ± 13.9	102.8 ± 25.0



Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM. El p-valor se analizó utilizando la prueba T Student. <sup>a</sup> p < 0.05, <sup>aa</sup> p < 0.01, <sup>aaa</sup> p < 0.001 vs NG; <sup>b</sup> p < 0.05, <sup>bb</sup> p < 0.01, <sup>bbb</sup> p < 0.001 vs IR. Abreviaturas: NG, normoglucémicos; IR, insulino-resistentes; T2D, diabéticos tipo 2; IMC, índice de masa corporal; HbA1c, hemoglobina glicosilada; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad.

Como se muestra en la Tabla 6, los individuos obesos con IFG mostraron niveles de glucosa y HbA1c superiores a los de individuos obesos NG, mostrando valores compatibles con el desarrollo de prediabetes, como indica la ADA; atendiendo a estos criterios, a partir de ahora se denominarán como obesos insulino-resistentes IR (A. Díaz-Ruiz et al., 2015; Tam et al., 2012). Por su parte, los obesos T2D mostraron niveles de glucosa y HbA1c significativamente superiores a los obesos IR y obesos NG, mostrando por otra parte un mayor peso absoluto e IMC total que los obesos IR y NG. Una vez establecidos los grupos, se obtuvieron cortes de tejido adiposo subcutáneo, que se utilizaron para su análisis por MALDI-IMS, siguiendo los mismos procedimientos descritos para los experimentos con muestras de tejido adiposo de rata. Este análisis permitió la discriminación de un total de 50.201 valores m/z en las muestras de tejido adiposo humano, los cuales fueron sometidos a un filtrado inicial por rango intercuartílico para disminuir su dispersión en la distribución de los datos. De esta manera, se obtuvieron un total de 5.000 valores m/z, sobre los cuales se llevó a cabo una prueba ANOVA de una vía para comparar las medias individuales de cada valor m/z dentro de cada grupo. El análisis estadístico de los datos permitió distinguir 2.615 valores m/z que se encontraban expresados de manera diferencial y significativa entre los tres grupos de estudio ( $P < 0.05$ ) (Fig. 35).

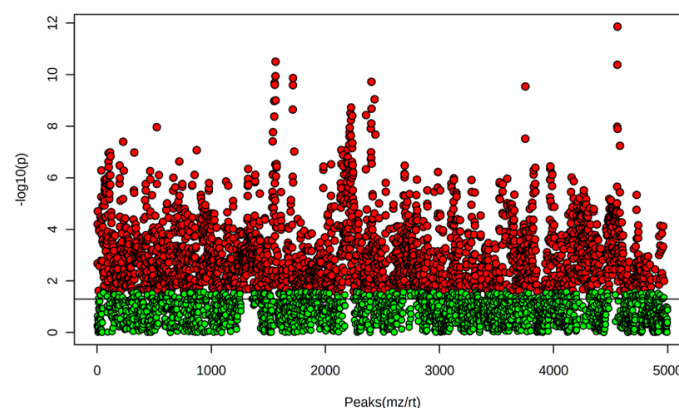
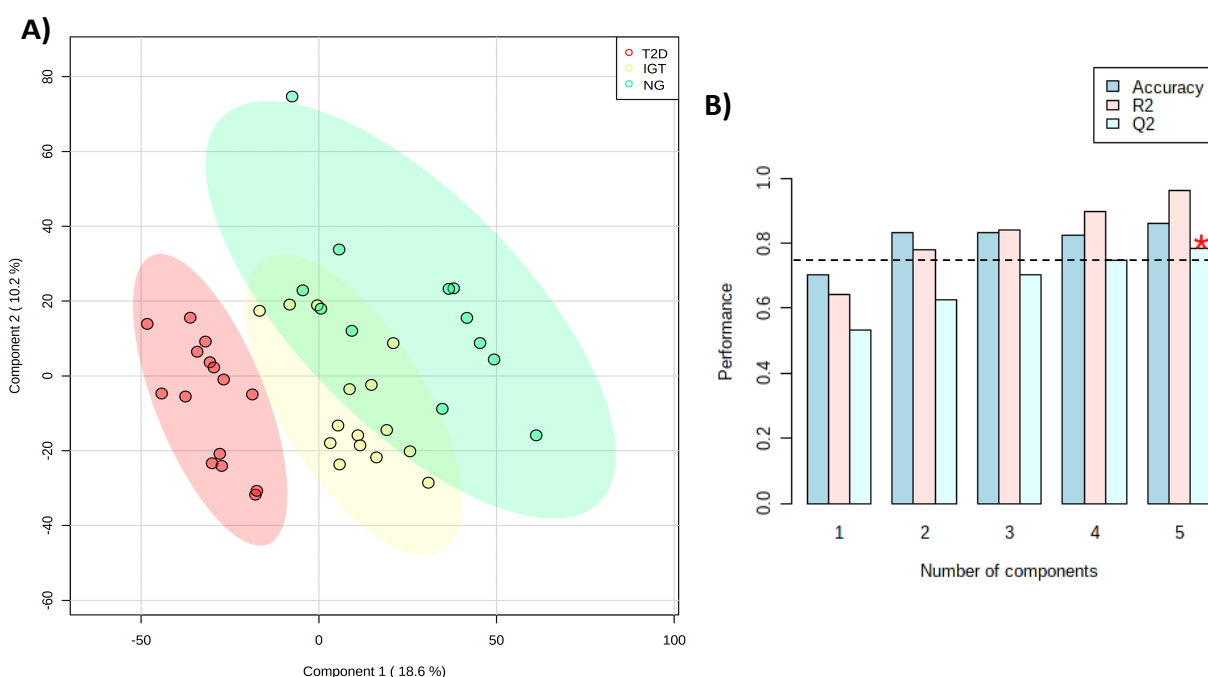


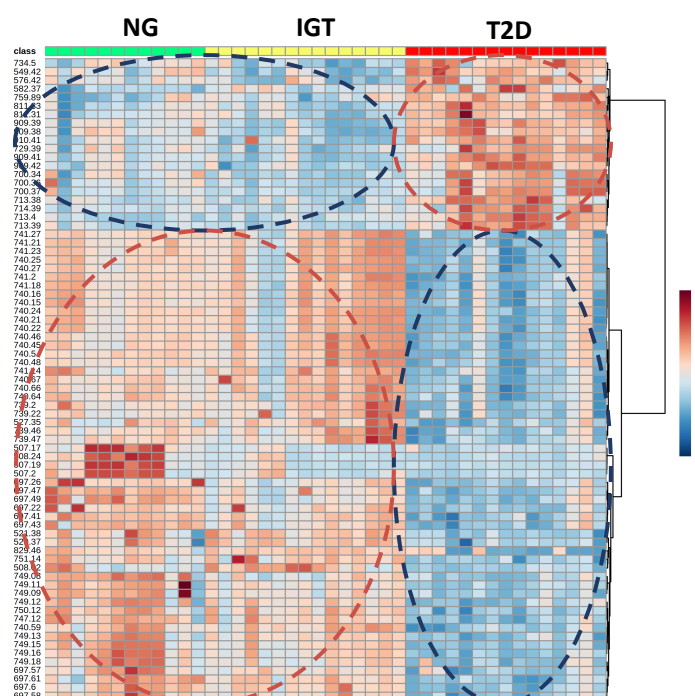
Figura 35. Análisis estadístico sobre el número de iones detectados mediante MALDI-IMS de manera diferencial en el tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos con diferentes perfiles glucídicos. Los círculos en rojo representan los iones significativos mientras que los verdes representan los iones no significativos al comparar la media y su varianza entre los tres grupos de estudio (ANOVA de una vía,  $p < 0.05$ ).

En segundo lugar, con estos datos se elaboró un modelo PLS-DA para predecir la pertenencia de cada muestra a su grupo experimental en base a su perfil lipídico. Como se muestra en la Fig. 36, observamos un marcado patrón de progresión fenotípica desde el grupo NG hasta el grupo T2D (Fig.36A), detectándose un efecto de solapamiento entre algunos pacientes del grupo NG con respecto al grupo IR. Este efecto podría explicarse por el hecho de que estos pacientes, aunque se ajustan al grupo NG según los criterios de diagnóstico de la ADA empleados para su clasificación en nuestro estudio, podrían estar en etapas iniciales del desarrollo de resistencia a insulina. No obstante, los grupos NG e IR presentan, globalmente, características discriminatorias relacionadas no solo con parámetros antropométricos o bioquímicos (Hb1Ac, glucosa en sangre; Tabla 6) si no también en cuanto a su perfil lipídico, establecido tanto por MALDI-IMS como por LC-QqQ MS/MS (Fig. 36).



**Figura 36. Análisis multivariante del perfil lipídico del tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos con diferentes perfiles glucídicos.** (A) Modelo de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), creado para predecir la pertenencia de cada muestra a su grupo experimental en función de su firma lipídica. La varianza explicada para cada componente se muestra entre paréntesis en el eje correspondiente. (B) Evaluación del rendimiento de las predicciones generadas por el modelo en base al número de componentes seleccionados. La línea negra discontinua fija el umbral para definir un modelo con alta capacidad de predicción. NG: normoglucémicos; IGT: pacientes con intolerancia a glucosa; T2D: diabéticos tipo 2.

Asimismo, la evaluación del rendimiento en las predicciones generadas por el modelo PLS-DA, determinó que los mejores resultados de predicción se obtenían al usar cinco componentes (Fig.36B). Así, los valores de precisión y los coeficientes  $Q^2$  y  $R^2$  requirieron de este número de componentes para superar el valor umbral que define el modelo como altamente predictivo (Fig.36B). No obstante, el modelo generado puede también clasificarse como bueno ya que sus coeficientes de evaluación se situaron siempre por encima de 0,5 a pesar del uso de un menor número de componentes (Joe et al., 2014). En paralelo y sobre la base del análisis estadístico, se escogieron los 75 iones más significativos entre los grupos de pacientes para la representación de su perfil de distribución por medio de un *heatmap* (Fig.37). Como se muestra en la figura, los grupos NG e IR tienden a mostrar un perfil de distribución homólogo entre sí y opuesto al observado para el grupo T2D. No obstante, encontramos un clúster de iones específicos localizados en la región m/z 507.17-508.24 que están sobreexpresados en el grupo NG respecto a los grupos IR y T2D. Por su parte, no se detectaron iones con expresión diferencial significativa y exclusiva en el grupo IR, aunque se observó una mayor presencia de iones específicos localizados en la región m/z 739.47-740.67.



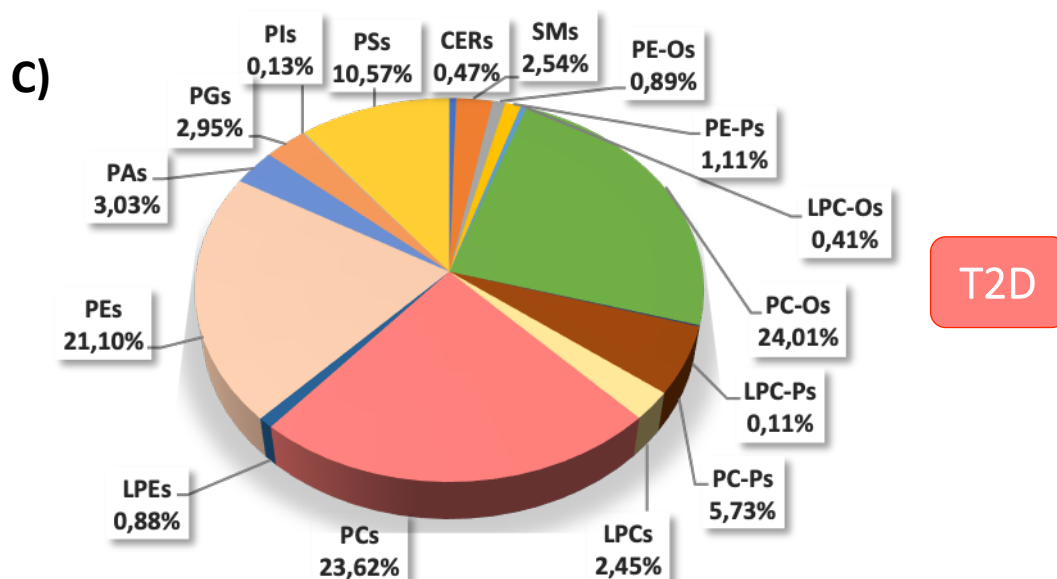
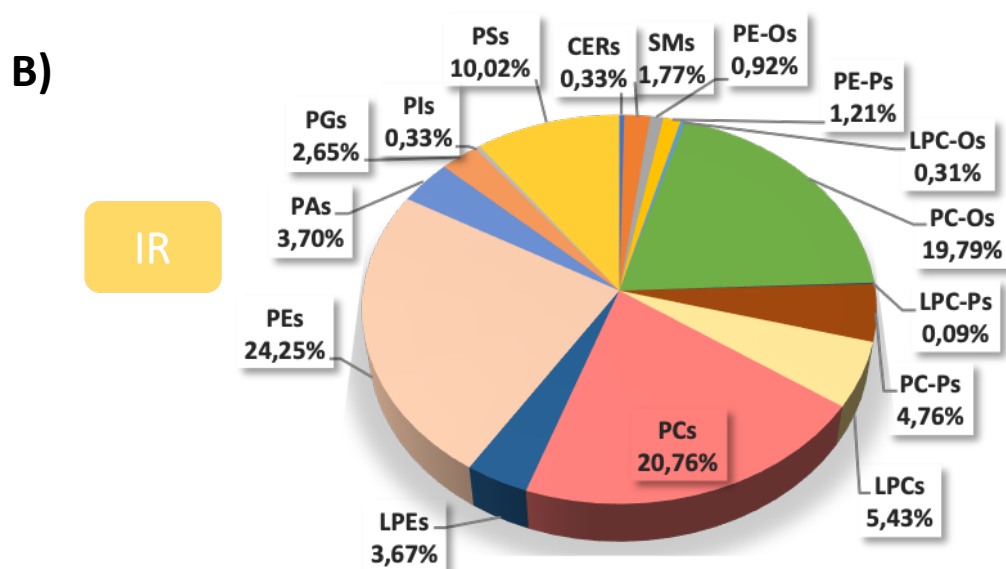
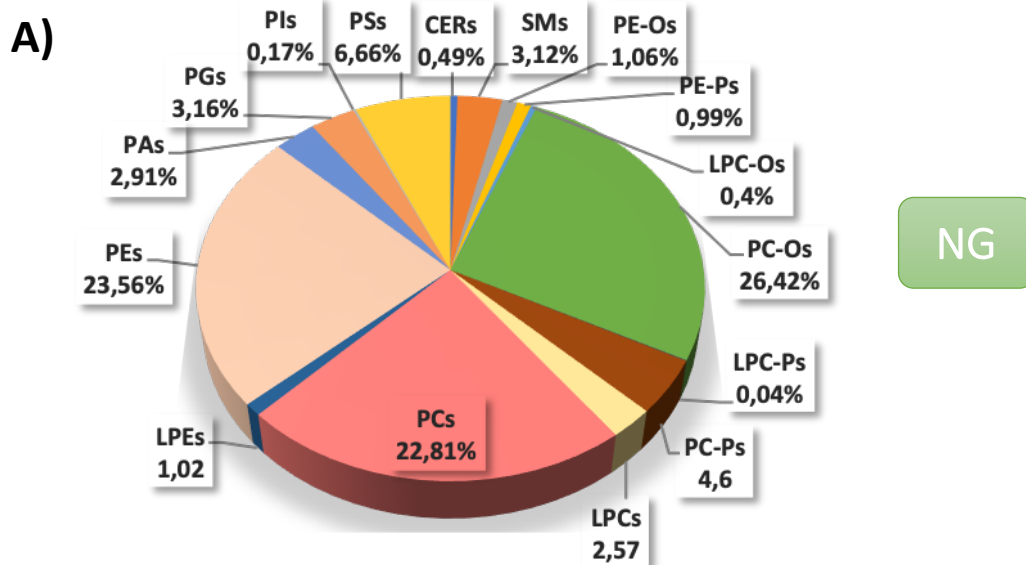
**Figura 37.** Análisis del perfil lipídico del tejido adiposo subcutáneo en obesidad y normoglucemia, resistencia a insulina o diabetes tipo 2. Representación gráfica (heatmap) de los 75 iones más significativos (prueba ANOVA) que se han detectado en el análisis del tejido adiposo subcutáneo procedente de los tres grupos de individuos obesos en estudio. La escala de -3(azul) a 3(rojo) representa la abundancia normalizada en unidades arbitrarias. NG: normoglucémicos; IGT: pacientes con intolerancia a glucosa; T2D: diabéticos tipo 2.

#### **4.3.1.- Análisis lipidómico dirigido por LC-QqQ MS/MS en muestras de tejido adiposo humano.**

En consonancia con el estudio previo en ratas, se llevó a cabo un análisis lipidómico dirigido con LC-QqQ para estudiar el perfil de distribución de glicerofosfolípidos en muestras de tejido adiposo subcutáneo humano. Como se muestra en la [Fig. 38](#), el análisis de los extractos lipídicos reveló importantes diferencias en la composición del lipidoma asociado a los grupos de estudio.

Por una parte, las PEs, PCs y PC-Os fueron las familias lipídicas más representadas en lipidoma del tejido adiposo humano obeso, independientemente de la sensibilidad a insulina de los individuos (21-24%, 21-24% y 20-26% del total de lípidos, respectivamente) ([Fig. 38](#)). Por otra parte, los lisofosfolípidos de colina (LPC-Os y LPC-P), ceramidas y Pls constituyeron las familias minoritarias observadas en los tres grupos experimentales (valores inferiores al 1% respecto al lipidoma total).

Respecto al análisis comparativo entre los tres grupos de individuos, se observó un incremento del 41,35% y del 16% en el contenido total de lípidos en el tejido adiposo en los individuos obesos IR y T2D, respectivamente, con respecto al grupo NG ([Fig.38D](#)). Dado este incremento significativo en el total de lípidos, se llevó a cabo un análisis de varianzas (ANOVA de una vía) de los valores absolutos correspondientes para cada familia lipídica para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de individuos obesos ([Fig.38D](#)). Así, observamos un aumento significativo en el contenido de éter-fosfolípidos y glicerofosfolípidos en los grupos IR y T2D con respecto al grupo NG. No obstante, se produjo disminución numérica, aunque no significativa, en los niveles de esfingomielinas en los grupos IR y T2D mientras que las ceramidas disminuyeron en el grupo IR y aumentaron en el grupo T2D con respecto al grupo NG ([Fig.38D](#)). Asimismo, cabe destacar que las familias que experimentaron una mayor variación en el grupo de éter-fosfolípidos fueron los LPC-Ps y los PE-Ps, mientras que dentro del grupo de glicerofosfolípidos se correspondieron con lisofosfolípidos (LPCs y LPEs), PAs y glicerofosfolípidos de señalización (Pls y PSs) ([Fig.38D](#)).



## D)

	NG	SEM	IR	SEM	T2D	SEM	P-valor
<b>CERs</b>	41.499,83	5.040,79	40.255,67	16.279,24	46.052,50	22.894,81	0,7567
<b>SMs</b>	265.885,25	41.281,77	213.877,67	24.601,94	251.048,00	25.857,60	0,1846
<b>PE-Os</b>	90.814,63	10.964,47	111.027,17	38.370,50	87.751,33	635,85	0,4001
<b>PE-Ps</b>	84.297,75	5.413,74	145.483,17	28.467,61	109.577,83	23.755,16	<b>0,0159</b>
<b>LPC-Os</b>	34.070,38	5.865,12	37.832,83	13.320,68	40.259,33	16.469,70	0,7938
<b>PC-Os</b>	2.254.848,63	102.329,18	2.386.839,17	220.292,59	2.375.586,83	240.726,59	0,5992
<b>LPC-Ps</b>	3.782,25	1.312,78	10.885,83	851,01	10.937,83	1.882,16	<b>0,0003</b>
<b>PC-Ps</b>	392.825,88	61.332,83	574.193,50	60.795,41	566.994,33	21.202,76	<b>0,0039</b>
<b>LPCs</b>	219.543,75	73.140,21	655.469,00	188.111,62	242.289,67	102.971,73	<b>0,0050</b>
<b>PCs</b>	1.946.506,75	138.152,74	2.503.748,50	172.042,77	2.336.573,83	335.070,20	<b>0,0308</b>
<b>LPEs</b>	86.730,13	12.436,08	442.202,33	159.668,60	87.326,33	66.873,69	<b>0,0028</b>
<b>PEs</b>	2.010.743,80	398.868,44	2.925.186,00	1.094.151,65	2.087.742,67	130.352,20	0,1646
<b>PAs</b>	248.654,38	55.892,09	446.223,83	101.587,02	299.265,67	94.482,11	<b>0,0435</b>
<b>PGs</b>	269.762,13	44.304,49	319.615,50	83.656,47	291.848,00	29.815,33	0,5334
<b>PIs</b>	14.762,60	2.616,38	39.635,17	7.307,70	12.875,33	3.543,87	<b>0,0001</b>
<b>PSs</b>	568.436,38	43.028,75	1.208.981,67	360.577,75	1.046.077,50	250.029,30	<b>0,0208</b>
<b>Total</b>	<b>8.533.164,5</b>		<b>12.061.457,0</b>		<b>9.892.207,0</b>		

Figura 38. Análisis comparativo del perfil lipidómico del tejido adiposo subcutáneo en obesidad y normoglucemia, resistencia a insulina o diabetes tipo 2. Los extractos lipídicos de tejido de tejido adiposo subcutáneo procedente de pacientes obesos normoglucémicos (NG), con intolerancia a glucosa (IGT) o diabéticos tipo 2 (T2D) fueron identificados mediante un análisis lipidómico dirigido (LC-QqQ MS/MS). (A) Gráfico comparativo de barras donde se muestra la frecuencia relativa de cada familia de lípidos en términos porcentuales para cada uno de los grupos experimentales. (B) Distribución estadística de frecuencias lipídicas para cada una de las familias detectadas y separadas por el grupo de estudio al que pertenece. El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de una prueba ANOVA de una vía. Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas (verde) a partir de un nivel de confianza superior al 95% ( $P < 0,05$ ). SEM: error estándar; CER: ceramidas; LPC: lisofosfatidilcolinas; LPE: lisofosfatidiletanolaminas; PA: ácido fosfatídico; PC: fosfatidilcolinas; PC-Os: alquilfosfatidilcolinas; PC-Ps: alquenilfosfatidilcolinas; PE: fosfatidiletanolaminas; PE-Os: alquilfosfatidiletanolaminas; PE-Ps: alquenilfosfatidiletanolaminas; PG: fosfatidilglicerol; IP: fosfatidilinositoles; PS: fosfatidilserinas; SM: esfingomielinas.

A continuación, se llevó a cabo el procedimiento de anotación lipídica de los resultados de MALDI-IMS, tomando como referencia las identificaciones realizadas a partir de los extractos lipídicos mediante el análisis lipidómico dirigido (LC-QqQ MS/MS). De esta manera, la integración de los datos procedentes de ambas técnicas proporcionó un total de 70 anotaciones lipídicas, que se recogen en la [Tabla 7](#) junto a sus coeficientes estadísticos.

Tabla 7. Listado de iones detectados mediante la técnica MALDI-IMS y posteriormente identificados como lípidos mediante LC-QqQ MS/MS en secciones de tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos.

	a)	b)	c)	Adduct	delta	p-value	-Log10(p)	Fisher's LSD		
								NG - IR	NG - T2D	IR - T2D
LPC (18:2)	519,33	519,33	520,34	[M+H] <sup>+</sup>	0,0002	0,0073	2,1344			*
PA (18:1_16:0)	674,49	674,49	675,5	[M+H] <sup>+</sup>	-0,0040	0,0010	2,9897	*		*
PA (18:2_18:0)	700,5	700,5	701,51	[M+H] <sup>+</sup>	0,0020	0,0081	0,2094	*		*
PA (22:6_18:0)	748,5	748,5	749,51	[M+H] <sup>+</sup>	0,0020	0,0008	3,0845	*	*	
PA (22:6_18:1)	746,49	746,49	747,5	[M+H] <sup>+</sup>	-0,0030	0,0016	2,8092	*	*	
PC (16:0_16:0)	733,56	733,56	734,57	[M+H] <sup>+</sup>	0,0005	0,0194	1,7116		*	
PC (18:0_18:1)	787,61	787,61	788,62	[M+H] <sup>+</sup>	-0,0040	0,0005	3,3275	*	*	
PC (18:2_16:0)	757,56	757,56	758,57	[M+H] <sup>+</sup>	0,0005	0,0180	1,7449		*	
PC (20:0_18:1)	815,64	815,64	816,647	[M+H] <sup>+</sup>	0,0004	0,0074	2,1287			*
PG (16:0_16:1)	720,49	720,49	721,5	[M+H] <sup>+</sup>	0,0010	0,0083	2,0806	*	*	
PG (20:0_18:0)	806,6	806,6	807,61	[M+H] <sup>+</sup>	0,0010	0,0241	1,6175	*	*	
PS (18:1_20:0)	817,58	817,58	818,587	[M+H] <sup>+</sup>	0,0030	0,0139	1,8575			*
PC (O-18:0_20:1)	801,66	801,66	802,67	[M+H] <sup>+</sup>	-0,0020	0,0004	3,4402		*	*
PE (O-16:0_18:1)	703,55	703,55	704,56	[M+H] <sup>+</sup>	-0,0010	0,0054	2,2661		*	*
LPC (P-18:0)	507,37	507,37	508,38	[M+H] <sup>+</sup>	-0,0040	0,0082	2,0854		*	*
Cer (d15:1_20:0)	551,53	551,53	552,54	[M+H] <sup>+</sup>	-0,0050	0,0051	2,2957			*
SM (d18:1_22:0)	786,66	786,66	787,67	[M+H] <sup>+</sup>	-0,0010	0,0030	2,5222	*	*	
SM (d18:1_24:0)	814,69	814,69	815,7	[M+H] <sup>+</sup>	0,0001	0,0022	5,6548	*	*	*
SM (d18:2_24:0)	812,68	812,67	813,68	[M+H] <sup>+</sup>	0,0040	0,0161	4,7934		*	*
LPG (16:0)	484,28	484,28	523,38	[M+K] <sup>+</sup>	-0,0020	0,0001	4,0623		*	*
PA (18:2_18:0)	700,5	700,5	739,6	[M+K] <sup>+</sup>	0,0030	0,0075	0,6127		*	*
PA (22:6_18:0)	748,5	748,5	787,6	[M+K] <sup>+</sup>	0,0030	0,0030	2,5222	*	*	
PC (16:0_14:0)	705,53	705,53	744,63	[M+K] <sup>+</sup>	-0,0010	0,0003	3,4854		*	*
PC (18:1_22:2)	839,64	839,64	878,74	[M+K] <sup>+</sup>	-0,0010	0,0104	1,9851	*	*	
PE (18:0_20:0)	775,61	775,61	814,71	[M+K] <sup>+</sup>	-0,0020	0,0017	2,7585		*	*
PG (18:0_18:1)	776,56	776,56	815,66	[M+K] <sup>+</sup>	-0,0050	0,0040	5,3948		*	*
PG (18:2)	508,28	508,28	547,38	[M+K] <sup>+</sup>	-0,0020	0,0001	0,3866		*	*
PS (18:1_20:0)	817,58	817,58	856,68	[M+K] <sup>+</sup>	0,0020	0,0004	3,3967	*		*
PC (P-18:0_22:6)	817,6	817,6	856,7	[M+K] <sup>+</sup>	-0,0030	0,0001	5,1976	*		*
PE (O-16:0_22:5)	751,55	751,55	790,65	[M+K] <sup>+</sup>	0,0001	0,0169	1,7727	*		*
SM (d18:1_24:0)	814,69	814,69	853,79	[M+K] <sup>+</sup>	0,0010	0,0001	4,2333	*	*	*
LPC (16:1)	493,32	493,32	516,31	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0030	0,0203	1,6932	*		*
LPC (18:2)	519,33	519,33	542,32	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0020	0,0057	2,2412	*	*	
LPE (20:4)	501,29	501,29	524,28	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0050	0,0031	2,5021	*		*
LPE (22:6)	525,29	525,29	548,28	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0050	0,0215	1,6675	*		
LPG (16:0)	484,28	484,28	507,27	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0001	0,0000	5,1935		*	*
PA (18:2_18:0)	700,5	700,5	723,49	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0040	0,0055	2,2594	*	*	



## RESULTADOS

PA (20:3_18:0)	726,52	726,52	749,51	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0002	0,0008	3,0845	*	*	
PC (20:4_17:0)	795,58	795,58	818,57	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0002	0,0039	2,4045	*		*
PE (16:0_18:1)	717,53	717,53	740,52	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0010	0,0006	3,2548		*	*
PE (18:1_20:1)	771,58	771,58	794,57	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0020	0,0014	2,8547	*		*
PE (18:1_20:4)	765,53	765,53	788,52	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0010	0,0012	2,9327	*		*
PE (18:1_22:6)	789,53	789,53	812,52	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0010	0,0008	0,3116	*		*
PG (16:1_16:1)	718,48	718,48	741,47	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0020	0,0001	3,9821		*	*
PI (18:2_18:2)	858,53	858,53	881,52	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0040	0,0209	1,6806	*	*	
PS (16:0_18:0)	763,54	763,54	786,53	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0040	0,0374	5,4275	*	*	*
PS (18:0_18:1)	789,55	789,55	812,54	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0020	0,0032	2,4998			*
PS (18:0_18:2)	787,54	787,54	810,53	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0040	0,0001	4,0705	*		*
LPC (O-17:0)	495,37	495,37	518,36	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0010	0,0016	2,7873	*	*	
LPC (O-19:0)	523,4	523,4	546,39	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0000	0,0001	3,8911		*	*
LPC (P-18:0)	507,37	507,37	530,36	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0010	0,0020	2,7024	*	*	
PC (P-16:0_20:5)	763,55	763,55	786,54	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0010	0,0000	4,1428		*	*
PC (P-18:0_20:5)	791,58	791,58	814,57	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0030	0,0074	2,1326	*		*
PE (O-16:0_18:1)	703,55	703,55	726,54	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0010	0,0223	1,6508	*		*
PE (P-16:0_19:0)	717,57	717,57	740,56	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0030	0,0000	4,9581		*	*
PE (P-16:0_20:0)	731,58	731,58	754,57	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0030	0,0120	1,9211	*	*	
Cer (d15:1_20:0)	551,53	551,53	574,52	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0030	0,0000	4,9187		*	*
SM (d16:1_16:0)	674,54	674,54	697,53	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0040	0,0016	2,8024		*	*
SM (d18:0_17:0)	718,6	718,6	741,59	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0010	0,0001	4,2678		*	*
SM (d18:0_18:2)	728,58	728,58	751,57	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0030	0,0089	2,0509	*	*	
SM (d18:1_17:0)	716,58	716,58	739,57	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0030	0,0000	5,0107		*	*
SM (d18:1_18:2)	726,57	726,57	749,56	[M+Na] <sup>+</sup>	-0,0020	0,0051	2,2895	*	*	
SM (d18:2_20:0)	756,61	756,61	779,6	[M+Na] <sup>+</sup>	0,0040	0,0101	1,9958	*	*	
LPG (16:0)	484,28	484,28	502,32	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	-0,0040	0,0001	4,2665		*	*
PC (18:0_16:0)	761,59	761,59	779,63	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0,0003	0,0024	2,6227	*	*	
PC (18:0_18:0)	789,62	789,62	807,66	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	-0,0040	0,0032	0,2491		*	
PE (20:0_20:3)	797,59	797,59	815,63	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	-0,0010	0,0001	4,0389		*	*
PG (16:0_18:3)	744,49	744,49	762,53	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0,0000	0,0001	4,0915		*	*
PC (O-18:0_18:2)	771,61	771,61	789,65	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0,0001	0,0090	2,0473	*		
PC (P-20:0_18:2)	797,63	797,63	815,67	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	-0,0040	0,0075	6,1243		*	*

(A) m/z neutra detectada por LC-MS/MS, (B) m/z neutra detectada por MALDI-TOF, (C) masa detectada por MALDI-TOF. El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de una prueba ANOVA de una vía seguido del método de la diferencia menos significativa (LSD) de Fisher. Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas a partir de un nivel de confianza superior al 95% ( $P < 0,05$ ). NG: normoglucémicos; IGT: pacientes con intolerancia a glucosa; T2D: diabéticos tipo 2. CERs: ceramidas; SMs: esfingomielinas; PE-Os: alquil fosfatidiletanolaminas; PE-Ps: alquenil fosfatidiletanolaminas; LPC-Os: alquil lisofosfatidilcolinas; PC-Os: alquil fosfatidilcolinas; LPC-Ps: alquenil lisofosfatidilcolinas; PC-Ps: alquenil fosfatidilcolinas; LPCs: lisofosfatidilcolinas; PCs: fosfatidilcolinas; LPEs: lisofosfatidiletanolaminas; PEs: fosfatidiletanolaminas; PAs: ácido fosfatídico; LPG: lisofosfatidilglicerol; PGs: fosfatidilglicerol; PIs: fosfatidilinositoles y PSs: fosfatidilserinas.

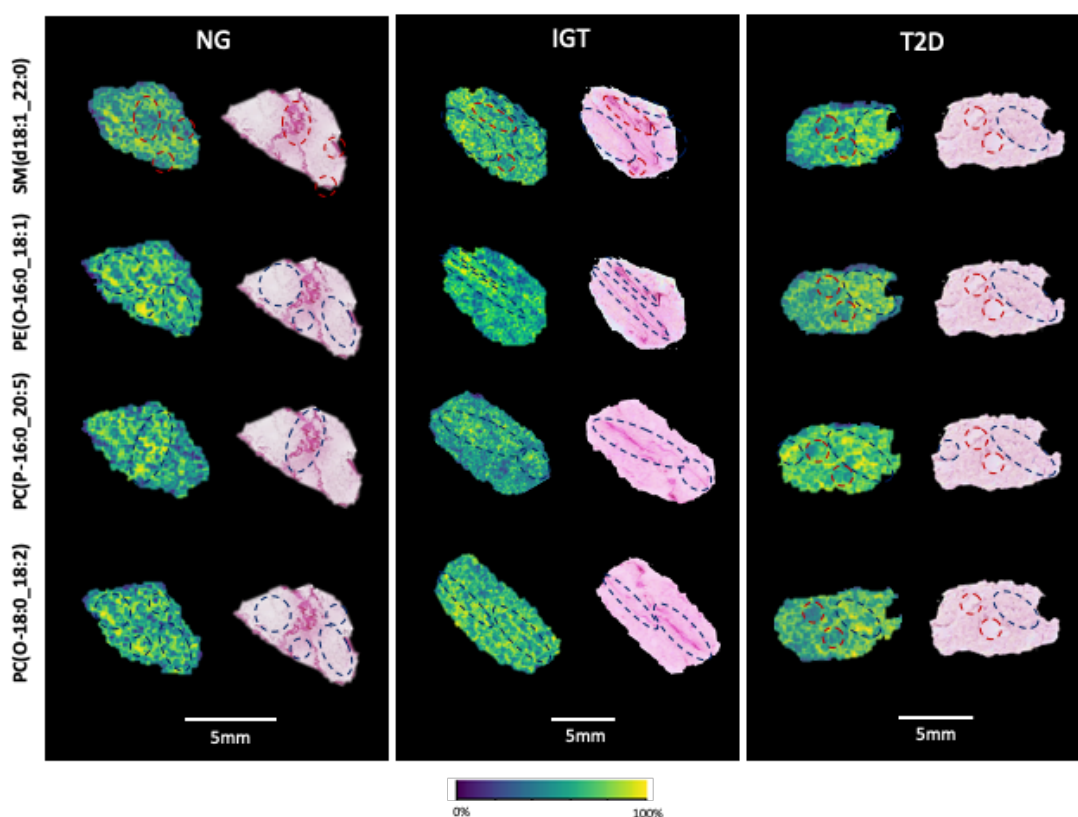


El análisis comparativo de grupos reveló la existencia de un mayor número de diferencias entre los grupos NG vs. T2D (49 lípidos con diferencias significativas) y entre los grupos IR vs. T2D (46 lípidos) que entre NG vs. IR (38 lípidos) (Tabla 7). Concretamente, encontramos diferencias entre NG y T2D en prácticamente todos los grupos de lípidos, excepto en LPE. En particular, todas las SM, PG, PI, así como los éter-LPC, LPG (16:0) y el aducto de Na<sup>+</sup> de Cer (d15:1\_20:0), y la mayoría de PA y PC, mostraron valores significativamente distintos entre ambos grupos de obesos (Tabla 7). Por su parte, los obesos T2D mostraron diferencias con el grupo IR en todas las PE, PG, PS y en LPG (16:0) y Cer (d15:1\_20:0), así como en la mayoría de éter-PC y éter-PE, PA y PG (Tabla 2). Finalmente, los obesos NG mostraron diferencias con respecto a los IR en lípidos representativos de todas las familias, a excepción de LPG, siendo la familia de PA la que acumuló más diferencias entre ambos grupos en cuanto a formas lipídicas distintas (Tabla 7).

#### 4.3.2.- Análisis del perfil de distribución espacial de lípidos mediante MALDI-IMS en pacientes obesos con distinta sensibilidad a insulina.

En consonancia con el estudio sobre el modelo animal de obesidad, se analizó el perfil de zonación lipídica en secciones de tejido adiposo humano de individuos obesos con diferentes perfiles glucémicos. Siguiendo el mismo protocolo utilizado anteriormente, se tomaron como referencia las anotaciones lipídicas obtenidas tras la integración de los datos de MALDI con los obtenidos a partir del análisis lipidómico dirigido (Tabla 7). En este apartado, las especies lipídicas fueron seleccionadas para su representación conforme a las tendencias observadas en sus niveles de concentración entre grupos, eligiéndose como ejemplos representativos de dichos cambios para los estudios de zonación. Concretamente, la esfingomielina SM(d18:1\_22:0) aumentó sus niveles tanto en el grupo IR como en el T2D en comparación al grupo NG. Por el contrario, la PE(O-16:0\_18:1) disminuyó sus niveles en los grupos IR y T2D con respecto al grupo NG. Por otro lado, los niveles de PC(O-18:0\_18:2) fueron superiores en el grupo IR y menores en el grupo T2D con respecto al grupo NG, mientras que PC(P-16:0\_20:5) mostró un comportamiento opuesto, disminuyendo en el grupo IR y aumentando en el grupo T2D con respecto al grupo NG. La zonación de los lípidos SM(d18:1\_22:0), PE(O-16:0\_18:1) y PC(O-18:0\_18:2) mostró un patrón de asociación entre las regiones ocupadas

mayoritariamente por adipocitos (Fig. 39). No obstante, mientras que los lípidos PE(O-16:0\_18:1) y PC(O-18:0\_18:2) también se localizaron en otras regiones del tejido, la SM(d18:1\_22:0) presentaba una disminución de su concentración en áreas ricas en fibras de matriz extracelular (i.e., fibróticas) (líneas discontinuas rojas). Por otra parte, la especie PC(P-16:0\_20:5) exhibió un patrón de distribución asociado a la fracción de estroma vascular, enriquecida en haces de colágeno, en particular en el grupo NG. De hecho, en el grupo IR se observó menos señal en esa localización, mientras que PC(P-16:0\_20:5) presentaba una distribución más homogénea en el tejido en el grupo T2D.



**Figura 39. Análisis del perfil de distribución espacial de lípidos en tejido adiposo humano de obesos con diferente grado de sensibilidad a insulina.** Las secciones de tejido adiposo fueron analizadas mediante MALDI-IMS y teñidas con hematoxilina/eosina para correlacionar la información histológica y molecular presente en el tejido. Las imágenes obtenidas permiten comparar tanto la distribución de la esfingomielina SM(d18:1\_22:0) como la correspondiente a ciertas formas de éter-fosfolípidos PE(O-16:0\_18:1), PC(P-16:0\_20:5) y PC(O-18:0\_18:2) en el tejido adiposo de pacientes obesos normoglucémicos (NG), con intolerancia a la glucosa (IGT) o con diabetes tipo 2 (T2D). Para llevar a cabo la selección de especies lipídicas, se tuvo en cuenta la visualización de tendencias representativas de aumento o disminución de la concentración entre grupos. La zonación de estas especies lipídicas muestra un enriquecimiento de las especies SM(d18:1\_22:0), PE(O-16:0\_18:1) y PC(O-18:0\_18:2) en las áreas ocupadas mayoritariamente por adipocitos, mientras que la especie PC(P-16:0\_20:5) se relacionó a su vez con la fracción estromal vascular, enriquecida en haces de colágeno. Las líneas discontinuas azules representan aquellas áreas donde el lípido se asocia de manera mayoritaria y las líneas discontinuas rojas representan las regiones donde o bien disminuyen o no se encuentran presentes.

#### 4.4.- Análisis de expresión de las enzimas implicadas en las rutas de biosíntesis de esfingolípidos y éter-fosfolípidos en adipocitos 3T3-L1.

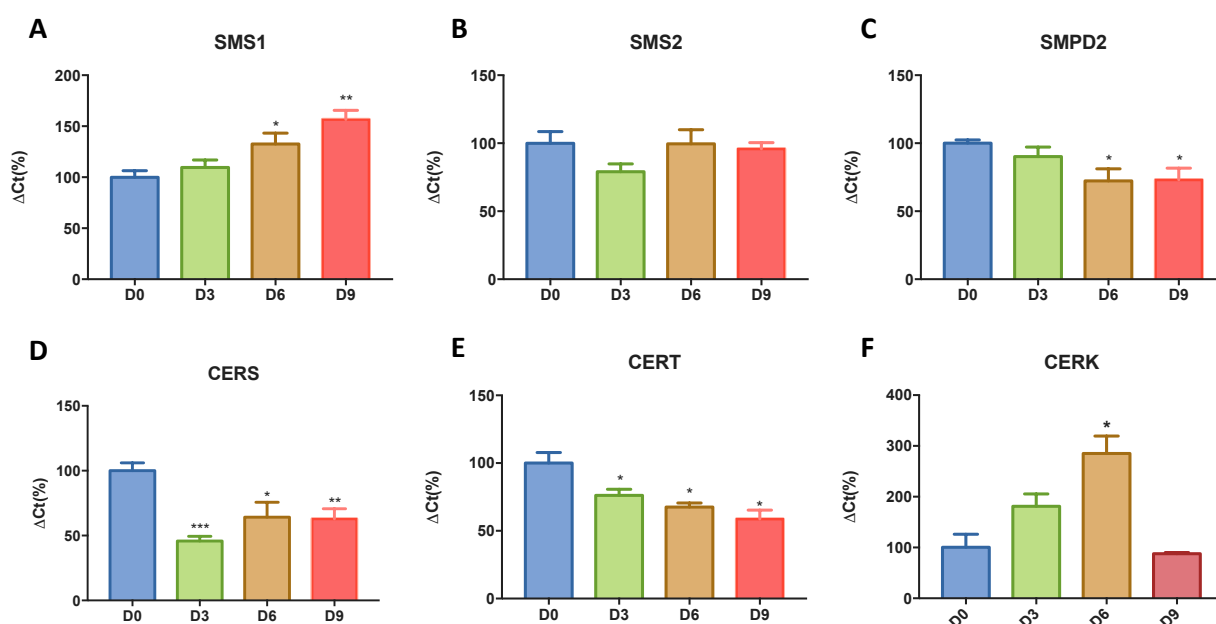
En este estudio, nos basamos en los resultados obtenidos a partir de los experimentos de lipidómica con muestras de tejido adiposo animal y humano, que mostraron diferencias tanto de contenido como de distribución de representantes de varias familias de lípidos, concretamente esfingomielinas y plasmalógenos, en relación a obesidad y/o cambios en la sensibilidad a la insulina. Por ello, como continuación a este trabajo de Tesis, nos planteamos analizar la regulación de la síntesis de estas especies lipídicas, utilizando para ello la línea de adipocitos 3T3-L1. Esta línea celular de fibroblastos de ratón requiere de un cocktail hormonal para su completa diferenciación a adipocitos, circunstancia que nos permite reproducir todos los estadios por los que transita el principal componente celular del tejido adiposo hasta su completa maduración (Ghaben & Scherer, 2019).

Concretamente, en este apartado analizamos el comportamiento de las enzimas implicadas en la producción de esfingolípidos y éter-fosfolípidos a lo largo del proceso de adipogénesis, así como en respuesta a insultos que ocurren en obesidad y resistencia a insulina, utilizando para ello modelos *in vitro* desarrollados y validados previamente en el laboratorio (Alberto Díaz-Ruiz et al., 2015; Guzmán-Ruiz et al., 2020).

##### 4.4.1.- Evaluación del perfil de expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de esfingolípidos y éter-fosfolípidos durante el proceso de diferenciación celular.

En este apartado, se evaluó el perfil de expresión de enzimas relacionadas con la biosíntesis de esfingolípidos y éter-fosfolípidos lo largo del proceso de adipogénesis (Días 0-9). Concretamente, se analizaron las dos enzimas esfingomielina sintasa (SMS1 y SMS2), implicadas en la producción de esfingomielinas, así como las enzimas esfingomielina fosfodiesterasa 2 (SMPD2), N-acilesfingosina amidohidrolasa (ASAH1), ceramida sintasa (CERS), ceramida transferasa (CERT) y ceramida quinasa (CERK), para evaluar la síntesis de ceramidas.

Como se muestra en la Fig. 40, la determinación de los niveles de expresión de ARNm de las enzimas SMS1 y SMS2 reveló un comportamiento dispar de estas enzimas. Así, mientras que SMS1 aumentó de manera progresiva a lo largo del proceso de diferenciación, alcanzando los niveles más elevados en el último día de diferenciación testado (Fig.40A), la expresión de SMS2 se mantuvo constante a lo largo de dicho proceso (Fig.40B). Respecto a las enzimas relacionadas con la síntesis de ceramidas, encontramos que la expresión de SMPD2, CERS y CERT fue superior al inicio de la diferenciación, disminuyendo bien progresivamente (SMPD2 y CERT) o ya al día 3 de diferenciación (CERS) (Fig.40C-E). Por el contrario, el contenido de ARN de CERK aumentó de manera progresiva hasta alcanzar un pico de expresión a D6, para disminuir posteriormente hasta los niveles encontrados al inicio de la diferenciación (Fig.40F).



**Figura 40.** Cuantificación de la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de esfingomielinas y ceramidas mediante qPCR durante la diferenciación de adipocitos 3T3-L1. (a) esfingomielina sintasa 1, (b) esfingomielina sintasa 2, (c) esfingomielina fosfodiesterasa 2, (d) ceramida sintasa, (e) ceramida transferasa, (f) ceramida quinasa. Los datos representados se expresan en porcentaje en relación al valor correspondiente a día 0. Los valores se representan con la media  $\pm$  el error estándar (n=6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 vs día 0. Prueba t Student.

Adicionalmente, analizamos mediante inmunoblotting cuantitativo el contenido proteico de las enzimas SMS1, SMS2, SMPD2 y ASAH1. En el caso de la enzima SMS1, localizada en el aparato de Golgi y encargada de producir esfingomielina a partir de

ceramidas (Huitema et al., 2004a), observamos un pico de expresión en el día 3 de diferenciación, que se continuó con una disminución progresiva en días posteriores (Fig.41A). De igual forma, la enzima SMS2, con idéntica función a SMS1 pero localizada en la membrana plasmática (Huitema et al., 2004b), experimentó un significativo y progresivo aumento en su expresión, siendo éste más pronunciado en etapas tardías de la diferenciación celular (Fig.41B). Por otra parte, tanto la enzima SMPD2 (localizada en la membrana plasmática, pero con función inversa a SMS2 (Kolak et al., 2012); como la enzima ASAH1, (localizada en endolisosomas y encargada de la ruta de reciclaje de ceramidas (Gebai et al., 2018); mostraron un patrón significativo de aumento progresivo de su contenido proteico a partir del día 3 de diferenciación (Fig.41C y D).

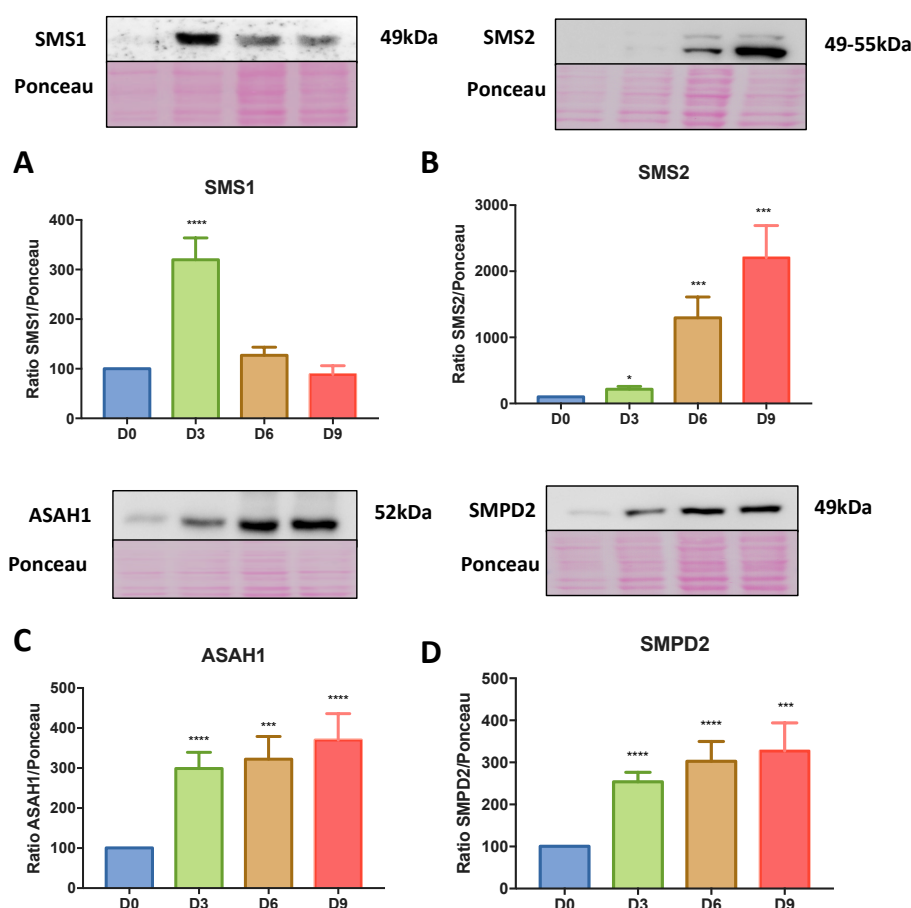


Figura 41. Cuantificación de la expresión proteica de las enzimas implicadas la síntesis de esfingomielinas y ceramidas mediante *immunoblotting* durante la diferenciación de adipocitos 3T3-L1. (a) *esfingomielina sintasa 1* (49 kDa), (b) *esfingomielina sintasa 2* (49-55 kDa), (c) *N-acilesfingosina amidohidrolasa 1* (52 kDa), (d) *esfingomielina fosfodiesterasa 2* (49 kDa). Los datos representados se expresan en una ratio entre la señal de la proteína de interés y el control de carga por rojo Ponceau. La gráfica representa en cada caso la media  $\pm$  el error estándar (n=3). \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs día 0. Prueba *t Student*.

Por otro lado, los éter-fosfolípidos representan una subclase importante de glicerofosfolípidos capaces de regular la fluidez de las membranas, la transducción de señales y la protección frente a las especies reactivas del oxígeno (N. E. Braverman & A. B. Moser, 2012; Wanders et al., 2010). Para estudiar la síntesis de éter-fosfolípidos se analizaron las siguientes enzimas durante el proceso de diferenciación: acil-CoA reductasa 1 de ácidos grasos (FAR1), O-aciltransferasa glicerofosfato (GNPAT), alquilglicerol fosfato sintasa (AGPS), 1-Acilglicerol-3-Fosfato O-Aciltransferasa 3 (AGPAT3), Colina/etanolamina fosfotransferasa 1 (CEPT1) y Colina fosfotransferasa 1 (CHPT1).

Concretamente, las enzimas FAR1, GNPAT y AGPS, están localizadas en peroxisomas y participan en los pasos iniciales de la síntesis de plasmalógenos (N. E. Braverman & A. B. Moser, 2012). Como se muestra en la [Fig.42](#), las enzimas FAR1 y AGPS presentan niveles de expresión elevados al inicio de la diferenciación, observándose un descenso significativo partir del día 3. Por su parte, a lo largo de la diferenciación se produce un aumento lineal y muy significativo de la expresión de la enzima GNPAT ([Fig. 42B](#)), que alcanza sus niveles de expresión más elevados en el último día de diferenciación. Por otra parte, las enzimas AGPAT3, CEPT1 y CHPT1, localizadas en el retículo endoplasmático y encargadas de las etapas de maduración de plasmalógenos (N. E. Braverman & A. B. Moser, 2012), presentaron un patrón de expresión más irregular, aunque, en general, mostraron un perfil creciente de expresión, alcanzando su máximo numérico en adipocitos diferenciados ([Fig. 42D-F](#)).

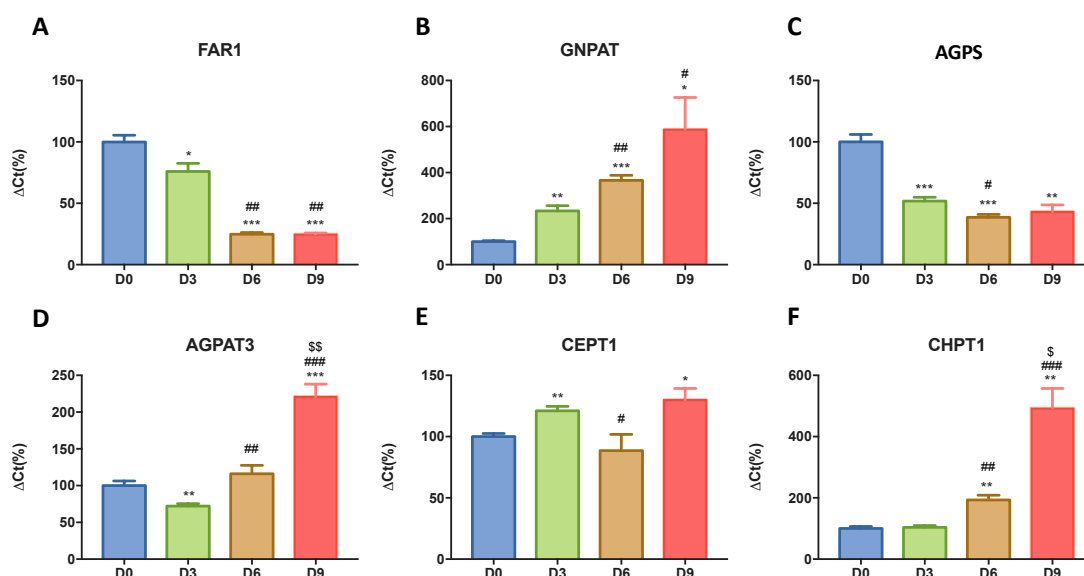


Figura 42. Cuantificación de la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de éster-fosfolípidos mediante qPCR durante la diferenciación de adipocitos 3T3-L1. (a) acil-CoA reductasa 1 de ácidos grasos, (b) O-aciltransferasa glicerofosfato, (c) alquilglicerol fosfato sintasa, (d) 1-Acilglicerol-3-Fosfato O-Aciltransferasa 3, (e) Colina/etanolamina fosfotransferasa 1, (f) Colina fosfotransferasa 1. Los datos representados se expresan en porcentaje en relación al día 0. Los valores se representan con la media  $\pm$  el error estándar ( $n=6$ ). \* $p < 0,05$  vs día 0, \*\* $p < 0,01$  vs día 0, \*\*\* $p < 0,001$  vs día 0; # $p < 0,05$  vs día 3, ## $p < 0,01$  vs día 3, ### $p < 0,001$  vs día 3; \$ $p < 0,05$  vs día 6, \$\$ $p < 0,01$  vs día 6, \$\$\$ $p < 0,001$  vs día 6. Prueba *t* Student.

De igual forma, nuestro estudio de *immunoblotting* usando anticuerpos contra AGPS y CEPT1, reveló una acumulación progresiva de estas enzimas a partir del día 3 de diferenciación, alcanzándose un incremento numérico máximo a día 6 (AGPS) o día 9 (CEPT1) de diferenciación (Fig.43).

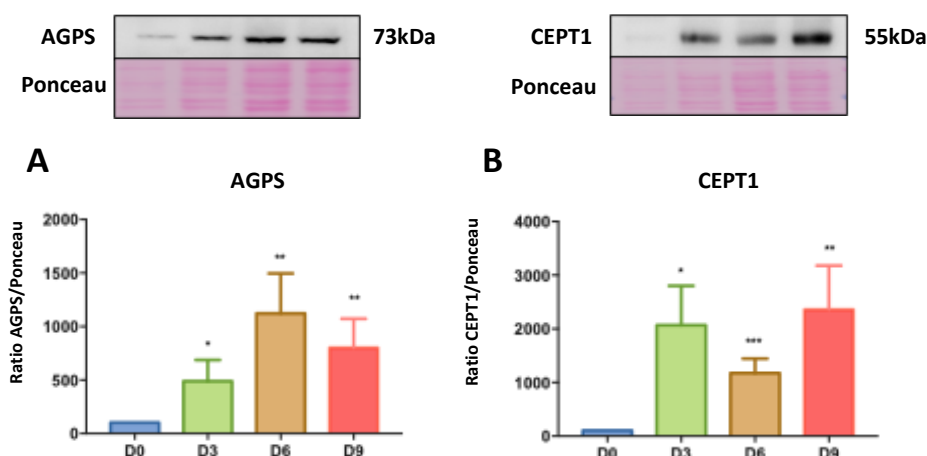
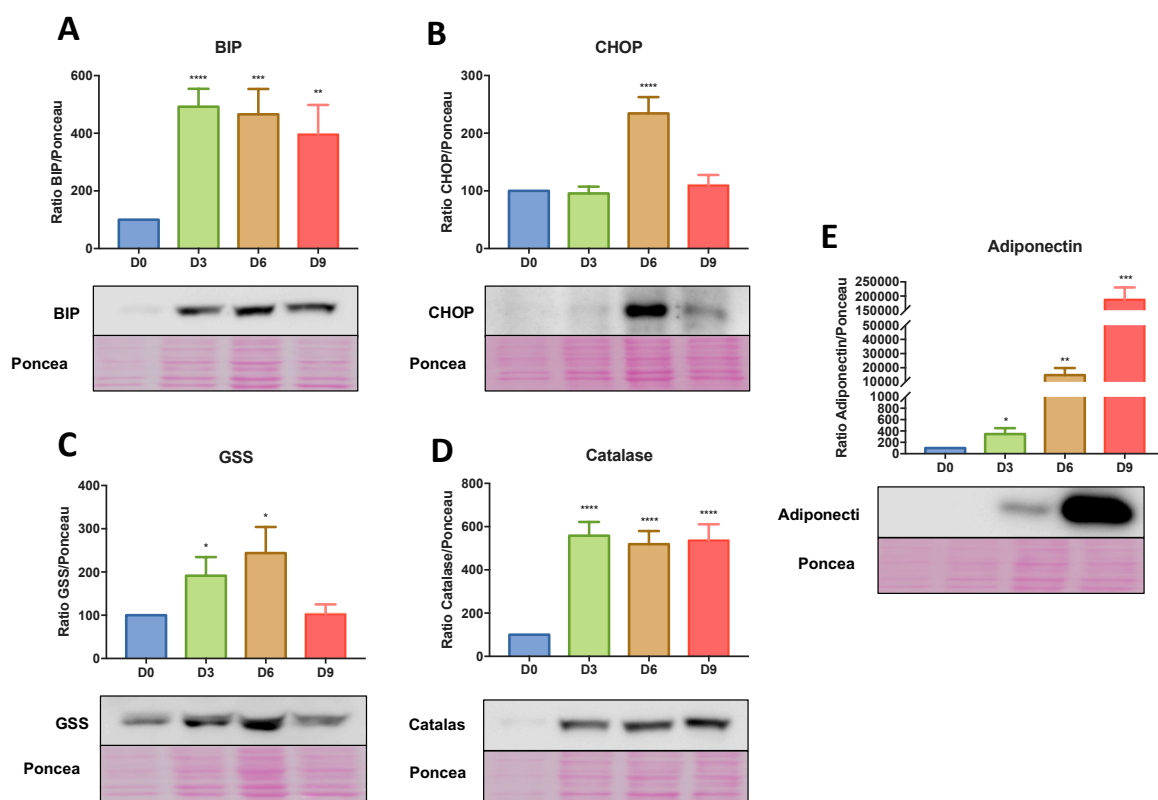


Figura 43. Cuantificación de la expresión proteica de enzimas implicadas en la síntesis de éster-fosfolípidos mediante *immunoblotting* durante la diferenciación de adipocitos 3T3-L1. (a) alquilglicerol fosfato sintasa (73 kDa), (b) Colina/etanolamina fosfotransferasa 1 (55 kDa). Los datos representados se expresan en una ratio entre la señal de la proteína de interés y el control de carga por rojo Ponceau. La gráfica representa en cada caso la media  $\pm$  el error estándar ( $n=3$ ). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs día 0. Prueba *t* Student.

Posteriormente, con el objetivo de evaluar el estado funcional de los adipocitos 3T3-L1 durante la adipogénesis, se evaluó tanto la expresión proteica de marcadores de estrés del retículo endoplasmático (BiP y CHOP) y oxidativo (Catalasa y GSS) como los de adiponectina intracelular (Fig.44). Por una parte, la enzima BiP aumentó su expresión de manera significativa desde el día 3 y durante todo el proceso de diferenciación, mientras que CHOP mostró un pico de expresión transitorio a día 6, recuperando los niveles basales al final de la diferenciación (Fig.44, A y B). Por otra parte, las enzimas GSS y catalasa aumentaron su expresión proteica de manera significativa a partir del día 3 de diferenciación, manteniéndose elevada hasta el final de este proceso en el caso de la segunda, mientras que el contenido de GSS disminuyó tras alcanzar niveles numéricos máximos a día 6 (Fig.44, C y D). Finalmente, tal y como se esperaba, los niveles de expresión proteica de adiponectina aumentaron de forma continua conforme avanza el proceso de diferenciación celular, especialmente a partir del día 6 (Fig.44E).



**Figura 44.** Cuantificación de la expresión proteica de enzimas relacionadas con el metabolismo energético y estrés del retículo endoplasmático u oxidativo durante la diferenciación de adipocitos 3T3-L1. (a) proteína de inmunoglobulina de unión (78 kDa), (b) CCAAT / potenciador de la proteína de unión proteína homóloga (27 kDa), (c) glutatión sintetasa (52 kDa), (d) Catalasa (60 kDa) y (e) adiponectina. Los datos representados se expresan en una ratio entre la señal de la proteína de interés y el control de carga por rojo Ponceau. La gráfica representa en cada caso la media  $\pm$  el error estándar (n=3). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 y \*\*\*\*p < 0,001 vs día 0. Prueba t Student.

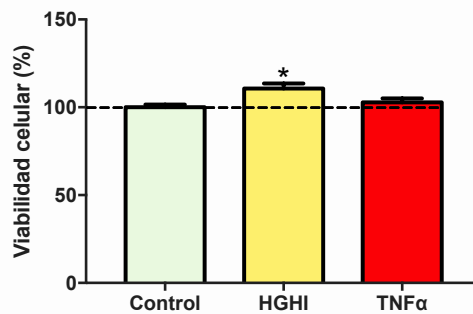


#### 4.4.2.- Regulación de la biosíntesis de esfingolípidos y éter-fosfolípidos en modelos de obesidad y resistencia a insulina.

En este estudio, se emplearon dos modelos de adipocitos *in vitro* que simulan las condiciones presentes durante en obesidad y resistencia a la insulina, i.e., hiperglucemia/hiperinsulinemia e inflamación. El objetivo de este trabajo era evaluar el grado de influencia de estas condiciones sobre el metabolismo de lípidos, y de manera más específica, sobre la regulación de las enzimas implicadas en la biosíntesis de esfingolípidos y éter-fosfolípidos. Para llevarlo a cabo, se utilizaron adipocitos 3T3-L1 a día 6 de diferenciación, los cuales fueron expuestos a tratamientos crónicos con altas concentraciones de glucosa e insulina (HGHI), como modelo de hiperglucemia/hiperinsulinemia, o  $\text{TNF}\alpha$ , como modelo de inflamación, de acuerdo con los parámetros establecidos y validados previamente por el grupo de investigación (Alberto Díaz-Ruiz et al., 2015; Guzmán-Ruiz et al., 2020). En ambos modelos, las células muestran resistencia a insulina, como demuestra su incapacidad para fosforilar el intermediario de señalización del receptor de insulina, la quinasa Akt, en comparación con las células en condiciones control en respuesta al tratamiento con insulina (100 nmol/L, 15 min) (Alberto Díaz-Ruiz et al., 2015; Guzmán-Ruiz et al., 2020).

#### 4.4.3.- Análisis de la viabilidad celular tras exposición a los tratamientos HGHI y $\text{TNF}\alpha$ .

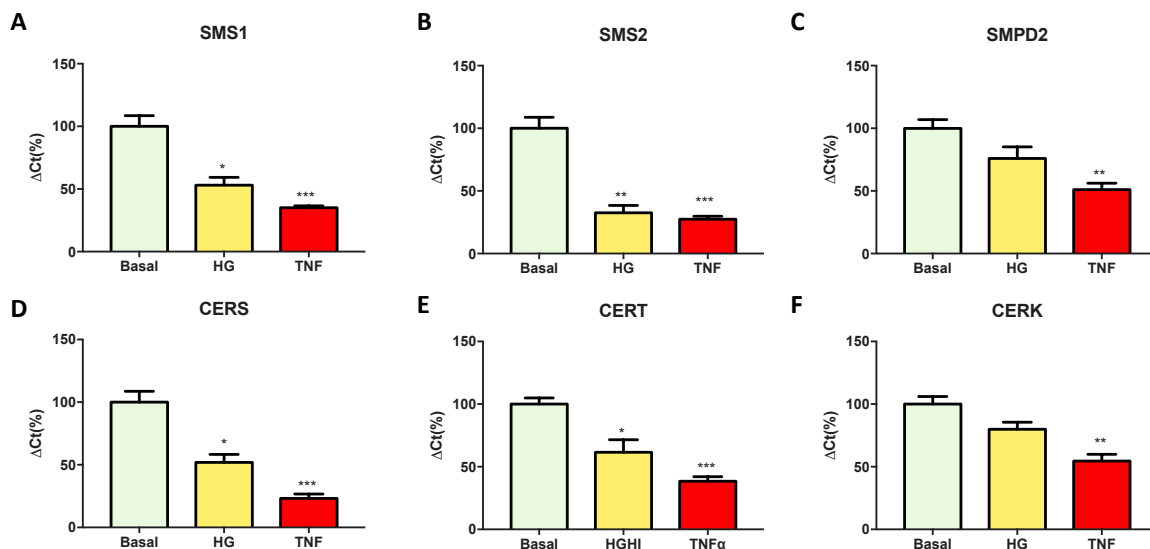
Con el objetivo de determinar previamente si los tratamientos con HGHI y  $\text{TNF}\alpha$  tenían alguna incidencia sobre la viabilidad de los cultivos celulares, se procedió a realizar un ensayo MTT. Esta prueba se usa para evaluar la actividad mitocondrial de las células viables, gracias a la reducción de sales de tetrazolio a formazán mediada por deshidrogenasas mitocondriales (Mosmann, 1983). El análisis de los resultados obtenidos reveló que ninguno de los tratamientos tuvo una incidencia negativa sobre la viabilidad celular de los cultivos, si bien se produjo un ligero, aunque significativo aumento de la actividad mitocondrial para el tratamiento con HGHI (Fig.45).



**Figura 45.** Ensayo de viabilidad celular mediante ensayo MTT en adipocitos 3T3-L1 tras su exposición a los tratamientos con HGHI y TNFα. Cuantificación de los niveles de absorbancia medidos a 570nm para cada uno de los grupos de estudio. Los datos están expresados en porcentaje (%) con respecto a su control (100%) y se presentan como la media ± error estándar (n=6 réplicas). \*p<0,05 vs. control.

#### 4.4.4.- Efectos de la exposición a los tratamientos HGHI y TNFα sobre la biosíntesis de esfingolípidos.

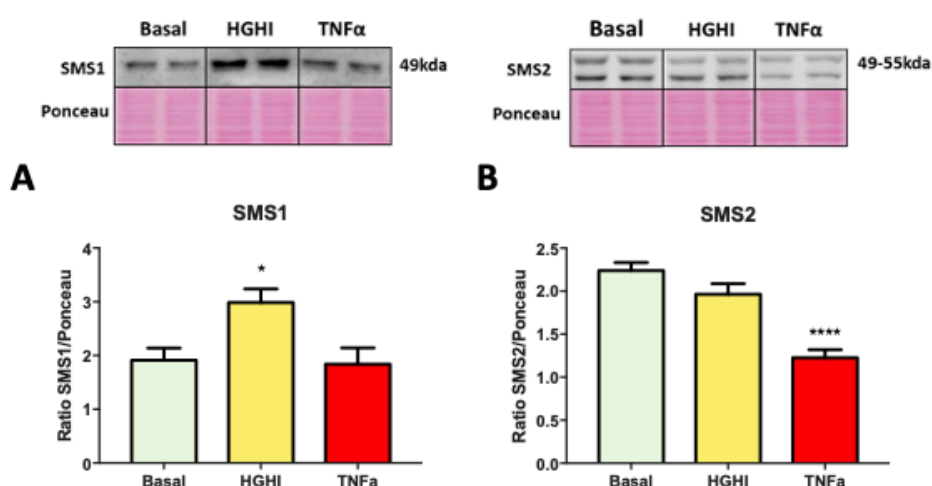
En este apartado, se evaluó el perfil de expresión de las enzimas relacionadas con la biosíntesis de esfingolípidos en respuesta a los dos insultos obesogénicos. Tal y como se observa en la Fig. 46, ambos tratamientos produjeron un descenso generalizado en la expresión génica tanto de las enzimas que producen o transportan ceramidas en el retículo endoplasmático (CERS, CERT y CERK) como de aquellas encargadas de la síntesis de esfingomielinas en el aparato de Golgi (SMS1) o en la membrana plasmática (SMS2).



**Figura 46.** Cuantificación de la expresión de las enzimas implicadas la síntesis de esfingomielinas y ceramidas mediante qPCR en modelos in vitro de adipocitos 3T3-L1. Evaluación de la expresión génica de las enzimas tras su exposición a los tratamientos con alta glucosa/alta insulina (HGHI) o ambiente proinflamatorio con TNFα. (a) esfingomielina sintasa 1, (b) esfingomielina sintasa 2, (c) esfingomielina fosfodiesterasa 2, (d) ceramida sintasa, (e) ceramida transferasa, (f) ceramida quinasa. Los datos representados se expresan en porcentaje con respecto al grupo basal. Los valores se representan con la media ± el error estándar (n=6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 vs basal. Prueba t Student.

Por su parte, el tratamiento con HGHI provocó un ligero, aunque no significativo, descenso en la expresión génica de la proteína SMPD2, localizada en la membrana plasmática y encargada de sintetizar ceramidas a partir de esfingomielinas. A pesar de la tendencia decreciente común en ambos tratamientos, la exposición crónica al ambiente proinflamatorio provocó un mayor descenso en la expresión génica de todas las enzimas testadas (Fig.46).

De manera paralela, se analizó mediante *immunoblotting* cuantitativo el contenido proteico de las enzimas SMS1, SMS2, SMPD2 y ASAH1 en respuesta a los tratamientos. De forma específica, el tratamiento con HGHI indujo un aumento significativo en el contenido proteico de SMS1 y SMPD2, manteniendo esta tendencia al alza para la enzima ASAH1, aunque no de manera significativa (Fig.30). También observamos que este tratamiento no afectó de manera destacable a la expresión proteica de SMS2, a pesar de que ésta experimentó un ligero descenso en sus niveles globales de expresión (Fig.30). Por su parte, el tratamiento con TNF $\alpha$  provocó un notable descenso en los niveles proteicos de SMS2, así como un ligero, aunque no significativo, aumento de SMPD2. En último lugar, el contenido de ASAH1 se vio ligeramente disminuido frente a la exposición crónica al ambiente proinflamatorio inducido por TNF $\alpha$  mientras que no éste no tuvo efecto sobre la enzima SMS1 (Fig.30).



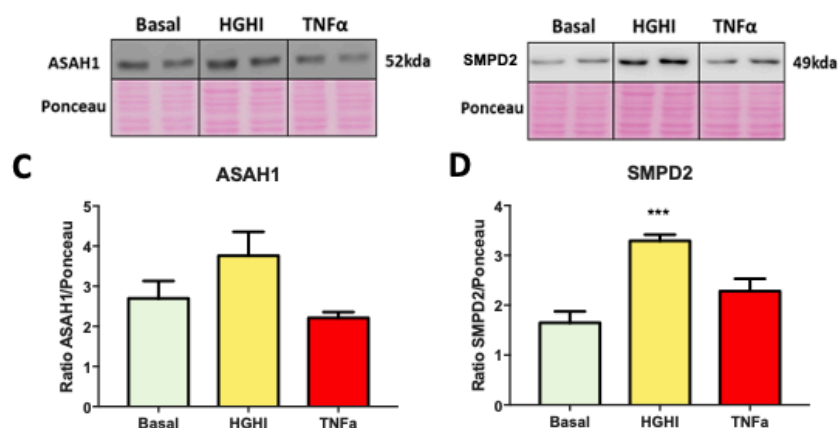
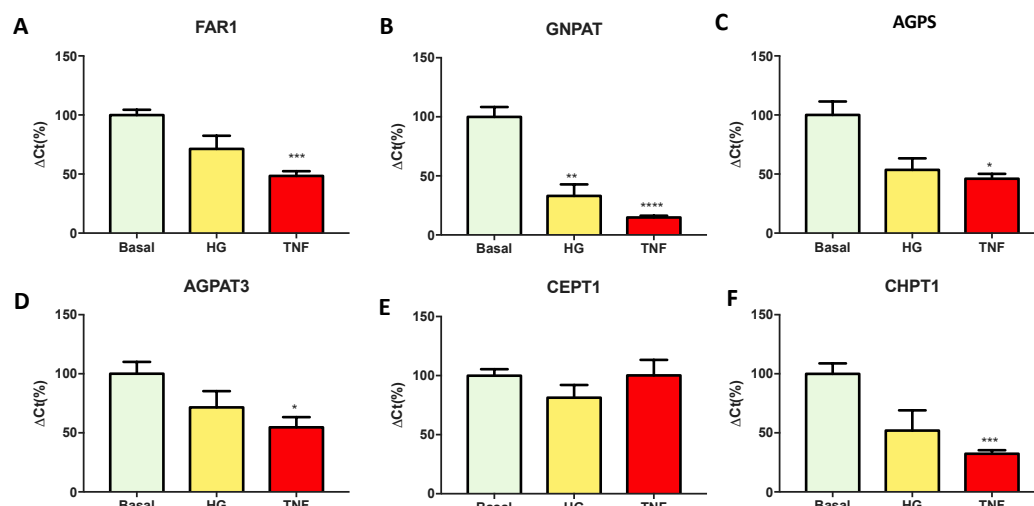


Figura 47. Cuantificación de la expresión de las enzimas implicadas la síntesis de esfingomielinas y ceramidas mediante *Western Blotting* en modelos in vitro de adipocitos 3T3-L1. Evaluación de la expresión proteica de las enzimas tras su exposición a HGHI o ambiente proinflamatorio con TNFα. (a) *esfingomielina sintasa 1* (49 kDa), (b) *esfingomielina sintasa 2* (49-55 kDa), (c) *N-acilesfingosina amidohidrolasa 1* (52 kDa), (d) *esfingomielina fosfodiesterasa 2* (49 kDa). Los datos representados se expresan en una ratio entre la señal de la proteína de interés y el control de carga por rojo Ponceau. La gráfica representa en cada caso la media  $\pm$  el error estándar (n=3). \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001. *Prueba t Student*.

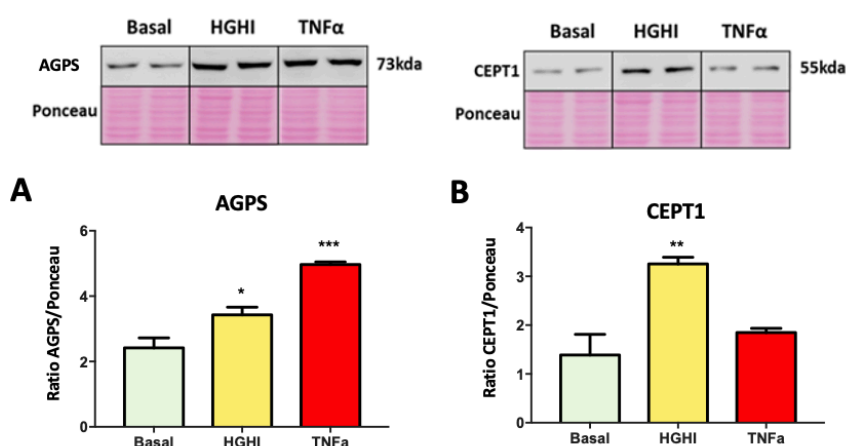
#### 4.4.5.- Efectos de la exposición a los tratamientos HGHI y TNFα sobre la biosíntesis de éter-fosfolípidos.

A continuación, se evaluó el perfil de expresión de las enzimas que participan en la biosíntesis de éter-fosfolípidos en adipocitos 3T3-L1 tras exponerlos a condiciones de hiperglucemia/hiperinsulinemia (HGHI) o ambiente proinflamatorio con TNFα. En primer lugar, la exposición a ambos tratamientos provocó un descenso generalizado en la expresión génica de las enzimas localizadas en el peroxisoma, FAR1, GNPAT y AGPS (Fig.48A-C), siendo este más pronunciado en el caso del tratamiento con TNFα. Esta tendencia se repitió para las enzimas encargadas de producir éter-fosfolípidos en el retículo endoplasmático, salvo CEPT1, cuyo contenido no se vio alterado por ninguno de los tratamientos aplicados (Fig.48D-F).



**Figura 48.** Cuantificación de la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de éster-fosfolípidos mediante qPCR en modelos *in vitro* de adipocitos 3T3-L1. Expresión génica de las enzimas tras su exposición a HGHI o ambiente proinflamatorio con TNF $\alpha$ . (a) acil-CoA reductasa 1 de ácidos grasos, (b) O-aciltransferasa glicerofosfato, (c) alquilglicerol fosfato sintasa, (d) 1-Aciliglicerol-3-Fosfato O-Aciltransferasa 3, (e) Colina/etanolamina fosfotransferasa 1, (f) Colina fosfotransferasa 1. Los datos representados se expresan en porcentaje con respecto al grupo basal. Los valores se representan con la media  $\pm$  el error estándar (n=6). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 vs basal. Prueba t Student.

De manera complementaria, se analizó el contenido proteico de las enzimas AGPS y CEPT1 por *immunoblotting*. Los resultados muestran una elevación del contenido de ambas enzimas en respuesta al tratamiento con HGHI mientras que el tratamiento con TNF $\alpha$  solo afectó a la enzima AGPS, provocando un significativo aumento en sus niveles de expresión proteica (Fig.49).



**Figura 49.** Cuantificación de la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de éster-fosfolípidos mediante Western Blotting en modelos *in vitro* de adipocitos 3T3-L1. Expresión proteica de las enzimas implicadas en la síntesis de éster-fosfolípidos tras su exposición a HGHI o ambiente proinflamatorio con TNF $\alpha$ . (a) alquilglicerol fosfato sintasa (73 kDa), (b) Colina/etanolamina fosfotransferasa 1 (55 kDa). Los datos representados se expresan en una ratio entre la señal de la proteína de interés y el control de carga por rojo Ponceau. La gráfica representa en cada caso la media  $\pm$  el error estándar (n=3). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 vs basal. Prueba t Student.

Finalmente, se ha descrito previamente que los marcadores inflamatorios y de estrés del retículo endoplasmático se encuentran elevados en pacientes que sufren obesidad (Pagliassotti et al., 2016). En consecuencia, se analizó el efecto producido por los tratamientos con HGHI o  $\text{TNF}\alpha$  sobre BiP y CHOP, como marcadores de estrés del retículo endoplasmático, y catalasa y GSS, como marcadores de estrés oxidativo, además de adiponectina, como marcador de la diferenciación de los adipocitos (Fig.50). Por una parte, el tratamiento con HGHI produjo un descenso significativo de la enzima BiP y un aumento de GSS, pero no tuvo efecto alguno sobre CHOP, catalasa o adiponectina (Fig.50, A y C). Observamos una tendencia a la disminución en el contenido de catalasa y adiponectina en respuesta a HGHI, que también se observó tras el tratamiento con  $\text{TNF}\alpha$ , aunque en este último caso sí alcanzó diferencias estadísticamente significativas (Fig.50, D-E). En el caso de CHOP, se observó una tendencia a aumentar en células expuestas a HGHI y, en mayor medida, a  $\text{TNF}\alpha$ , aunque en ningún caso dicho aumento alcanzó valor estadístico (Fig.50B).

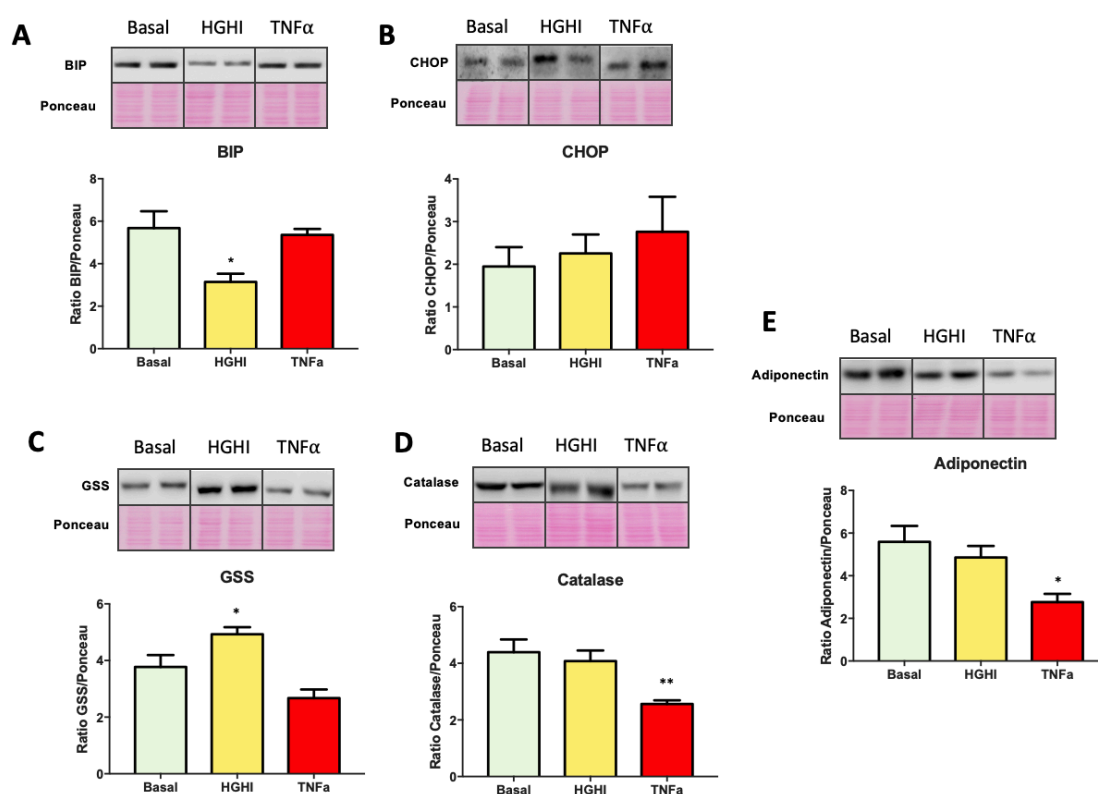


Figura 50. Cuantificación de la expresión proteica de enzimas relacionadas con el metabolismo energético y estrés del retículo endoplasmático u oxidativo en modelos *in vitro* de adipocitos 3T3-L1. (a) proteína de inmunoglobulina de unión (78 kDa), (b) CCAAT/ potenciador de la proteína de unión proteína homóloga (27 kDa), (c) glutatión sintetasa (52 kDa), (d) Catalasa (60 kDa) y (e) adiponectina. Los datos se expresan el ratio entre la señal de la proteína y el control de carga (rojo Ponceau). La gráfica representa en cada caso la media  $\pm$  el error estándar ( $n=3$ ). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\*\* $p < 0,001$  vs día 0. *t Student*.







DISCUSIÓN



La obesidad es una patología compleja y multifactorial en la que influyen desde factores genéticos y ambientales hasta endocrinos y neuronales, entre otros (Blüher, 2019). A pesar de que en los últimos años se han producido avances significativos en el estudio de la obesidad y sus comorbilidades, aun no se conocen completamente los mecanismos que subyacen en el desarrollo de resistencia a insulina y/o diabetes tipo 2. A lo largo de las últimas décadas, el interés por investigar estos mecanismos e identificar biomarcadores útiles que definan la obesidad, ha fomentado el uso de diferentes técnicas “ómicas” aplicadas al estudio de tejido adiposo y otros tejidos relacionados cuya fisiología se ve alterada en dichas condiciones (Aleksandrova et al., 2020; López-Villar et al., 2015; Peinado et al., 2014). En este sentido, predominan los estudios genómicos y transcriptómicos del tejido adiposo, tanto de modelos animales de obesidad como humanos (Aleksandrova et al., 2020). También se han realizado estudios proteómicos de tejido adiposo murino (Novelle et al., 2017), así como de tejido adiposo humano, incluyendo estudios de nuestro laboratorio sobre la caracterización de sus componentes celulares separados (Peinado et al., 2011; Diaz-Ruiz et al., 2015; Guzman-Ruiz et al., 2020), o la respuesta a la pérdida de peso tras cirugía bariátrica (Moreno-Castellanos et al., 2016). Sin embargo, los estudios de lipidómica del tejido adiposo son menos numerosos, a pesar de que los lípidos constituyen componentes celulares esenciales que están presentes en todos los vertebrados (Fuchs, 2014).

Los recientes avances en el campo de la lipidómica han permitido ampliar de manera notable nuestra comprensión del alcance y complejidad de la desregulación de lípidos en la obesidad y las enfermedades metabólicas (Han, 2016). Esta potente herramienta analítica se puede utilizar tanto para caracterizar procesos fisiológicos como fisiopatológicos, ya que el metabolismo de los lípidos constituye el eje central en la fisiología de los adipocitos y el mantenimiento de la homeostasis energética (Aleksandrova et al., 2020). Mientras que una gran parte de los lípidos se almacena en los adipocitos como reserva de energía, otros lípidos son utilizados para construir membranas celulares o participar en procesos de señalización celular (Lapid & Graff, 2017). En este contexto, la lipidómica basada en espectrometría de masas está emergiendo como una potente herramienta de análisis para investigar la huella lipídica asociada al aumento del tejido adiposo en modelos animales y humanos. De hecho, ya

se han publicado algunos estudios lipidómicos relacionados con la obesidad, fundamentalmente de suero y, en menor medida, de tejido adiposo de modelos murinos y humanos (Henstridge & Bozaoglu, 2017). Sin embargo, solo existe un estudio lipidómico, publicado durante la redacción de esta Tesis Doctoral, que analiza la zonación de lípidos en este tejido (Fournelle et al., 2020).

Es por ello por lo que, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se han desarrollado y aplicado diferentes estrategias de análisis para evaluar tanto la composición del lipidoma como la distribución espacial de los lípidos contenidos en el tejido adiposo. De esta manera, se pretende contribuir al estudio de la obesidad y resistencia a insulina, aportando nuevas herramientas analíticas que permitan dilucidar los mecanismos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de la enfermedad metabólica.

### Aplicación de técnicas de MALDI IMAGING para el estudio del tejido adiposo.

Uno de los principales objetivos de este estudio era el desarrollo de un método que permitiera caracterizar la distribución espacial de lípidos en el tejido adiposo mediante el uso de la técnica MALDI-IMS. La versatilidad de esta técnica para mapear cambios en la distribución lipídica de los tejidos ha sido puesta de manifiesto en numerosas patologías (Korte et al., 2015; Lee et al., 2012; Stoeckli et al., 2001). Sin embargo, su aplicación en tejidos con alto contenido lipídico, como el tejido adiposo, especialmente en condiciones de obesidad, no había sido desarrollada hasta ahora, presumiblemente por la falta de protocolos eficientes para su análisis. En este tipo de muestras, la aplicación de esta técnica conlleva un gran desafío ya que los lípidos se movilizan tras la deposición de la matriz de ionización, impidiendo así el análisis espacial de analitos en su posición original dentro del tejido (Fournelle et al., 2020). Inicialmente se asumió que el empleo de secciones delgadas conllevaría una deslocalización minoritaria de analitos debido al pequeño volumen de líquido intracelular (citósol) (Anderson et al., 2015). Sin embargo, nuestros resultados preliminares descartaban esta hipótesis en tejidos grasos, por lo que tuvimos que diseñar estrategias específicas de preparación de la muestra para hacer viable su análisis mediante MALDI-IMS. En consecuencia, en este trabajo se describen todas las estrategias empleadas para optimizar cada una de las etapas críticas de preparación de la muestra, incluyendo métodos de seccionamiento de tejidos y de deposición de la matriz de ionización. Generalmente, los estudios de MALDI-IMS emplean secciones de tejido de un rango de grosor comprendido entre 4-20  $\mu\text{m}$  y a las cuales se les aplica una matriz de ionización (Thomas et al., 2012). En nuestro caso, se determinó empíricamente que el rango óptimo de corte estaba situado entre 14-16  $\mu\text{m}$ , permitiendo así una correcta manipulación del tejido sin llegar a comprometer el rendimiento del analizador de masas, tal y como describió previamente Caldwell et al. (Caldwell & Caprioli, 2005). Adicionalmente, los tejidos pueden ser embebidos en soluciones de polímeros para reforzar la consistencia del tejido y obtener secciones muy finas de tejidos (por debajo de 5  $\mu\text{m}$ ) (Sugiura et al., 2015). Sin embargo, este procedimiento resultó ser igual de ineficaz en la contención de lípidos del tejido adiposo que el método tradicional de corte por congelación en seco.

Está ampliamente aceptado que la aplicación de la matriz de ionización sobre la muestra constituye un elemento esencial para la obtención de imágenes de MALDI (Buchberger et al., 2018; R. J. A. Goodwin, 2012). Mientras que el desarrollo de nuevas matrices está enfocado en parámetros como la capacidad de absorción por el láser o su estabilidad al vacío (Leopold et al., 2018a), la mejora de los métodos de deposición conlleva un aumento en la resolución y sensibilidad de detección de los analitos de interés (Huizing et al., 2019). En esta línea, estudios recientes usando todo tipo de tejidos, demostraron que la deposición de la matriz afecta tanto al grado potencial de deslocalización de analitos como al tamaño de los cristales de matriz que se generan (Li et al., 2016), siendo ambos parámetros críticos para la viabilidad del análisis. Dado que la mayoría de los estudios de MALDI-IMS se han llevado a cabo para analizar proteínas y péptidos, el número de matrices y estudios encaminados al análisis de lípidos de manera exclusiva es reducido (Fuchs & Schiller, 2009; Touboul et al., 2011), lo que también limita el soporte bibliográfico para orientar el diseño de nuevos estudios lipidómicos en tejidos nada o escasamente explorados.

En nuestro estudio, se seleccionaron las matrices DAN, MBT, DHA y DHB ya que todas ellas se usan de manera rutinaria en el análisis de lípidos (Leopold et al., 2018; Thomas et al., 2012; (Perry et al., 2020). Los resultados obtenidos muestran que la aplicación de las matrices, bien por el uso de un sublimador o bien a través de una estación robótica, produjo una difusión exacerbada de los lípidos contenidos en la muestra. Estos resultados sugieren que, en mayor o menor medida, la redistribución de lípidos en el tejido adiposo se produce independientemente del método de aplicación o de la matriz seleccionada. Por otra parte, se emplearon distintas superficies para la deposición de la muestra y para las cuales se habían obtenido resultados positivos en estudios recientes (König, 2008; Nimesh et al., 2013; Norris & Caprioli, 2013; Zavalin et al., 2012; Y. Zhang et al., 2012). No obstante, ninguna de las superficies probadas resultó ser eficaz en la contención de los lípidos. Estudios previos con secciones completas de tejidos (Anderson et al., 2015; Khatib-Shahidi et al., 2006) o sometidas a tratamientos con calor (Goodwin et al., 2012), mostraron que el uso de cintas adhesivas y conductivas de carbón resultaba efectivo para prevenir la deslocalización de analitos durante los experimentos de MALDI-IMS. La aplicación de este método en secciones de tejido

adiposo congeladas supuso un gran avance para la optimización de un protocolo de MALDI-IMS, ya que preservaba la estructura anatómica del tejido al mismo tiempo que minimizaba la difusión de los analitos presentes en la muestra.

Por otra parte, se ha descrito que el método de aplicación de la matriz influye de manera directa sobre la calidad de los espectros obtenidos, así como sobre el total de identificaciones que se llevan a cabo en el tejido (Huizing et al., 2019). Los métodos habituales para depositar la matriz incluyen el uso de una estación robótica (Aerni et al., 2006), la electropulverización (ESI) (Jurchen et al., 2005) y el uso de un aerógrafo (Garrett et al., 2007). No obstante, también se ha extendido el uso de estrategias que prescinden del uso de solventes, como el uso de un sublimador (Hankin et al., 2007) o la deposición en seco (S. M. Puolitaival et al., 2008). Nuestros resultados, obtenidos tras la aplicación de DHA y DHB mediante métodos de deposición simple o mixta de la matriz, mostraron que la deposición simple de la matriz DHB mediante sprayer era el método más eficaz para el análisis de muestras de tejido adiposo depositadas sobre cinta de carbón conductiva. De hecho, se detectaron un mayor número de picos y de mayor intensidad en comparación con los obtenidos con la matriz DHA y con la deposición bien en seco o combinada de ambas matrices. Adicionalmente, estudios recientes han puesto de manifiesto la importancia de optimizar la solución de la matriz para obtener mejores resultados en cuanto a resolución y cuantificación de un mayor número de picos en el espectro (Leopold et al., 2018a; Smolira & Wessely-Szponder, 2015). Así, se llevaron a cabo experimentos para optimizar la solución de la matriz DHB, empleando diferentes ratios de la mezcla del solvente acetonitrilo/agua. Estos resultados revelaron que existía una proporcionalidad inversa entre la concentración de acetonitrilo y la intensidad de señal detectada, obteniéndose mejores resultados en la composición 50:50 (ACN/H<sub>2</sub>O) de la solución de la matriz.

Finalmente, dado que existen numerosos problemas que pueden afectar a la cuantificación de imágenes de espectrometría de masas (manipulación de la muestra, supresión iónica, normalización, etc.), está ampliamente aceptado que los análisis de MALDI-IMS sean respaldados por técnicas complementarias como LC-MS/MS (Irie et al., 2014; Shobo et al., 2016; Stepanka et al., 2019). De esta manera, para concederle un

mayor grado de robustez al análisis de las muestras por MALDI-IMS, la anotación lipídica de valor  $m/z$  obtenido mediante dicha técnica se asignó sobre la base de los resultados obtenidos del análisis de las mismas muestras mediante LC-MS. El uso de este tipo de aproximaciones requiere de un paso previo de extracción de lípidos, que debe optimizarse para cada tejido de manera individualizada. En nuestro caso, los resultados obtenidos con el uso de dos tipos de extractantes (MTBE y CM) y el protocolo SPE, mostraron que cada familia de lípidos se veía influenciada de forma distinta en función del extractante utilizado. Además, se observó que la implementación de un ratio 2:1 en el uso de CM para la extracción de lípidos en combinación con el análisis por LC-QqQ MS/MS permitió obtener un mayor número de identificaciones en estas muestras, ampliando así la base de datos requerida para la anotación lipídica de los valores  $m/z$  obtenidos por MALDI. En concreto, estos estudios nos permitieron establecer el lipidoma del tejido adiposo subcutáneo de rata, en el que observamos la predominancia de formas de fosfatidilcolina (PCs, Liso-PCs, PC-Os y PC-Ps) que, en conjunto, suman el 57% del total de fosfolípidos. Igualmente, detectamos una proporción elevada de SMs (9%) en el tejido adiposo, lo que podría estar relacionado con la abundancia de balsas lipídicas especializadas en los adipocitos, las caveolas, que están enriquecidas en colesterol y SMs (Parton et al., 2020).

En conclusión, en este trabajo hemos establecido un protocolo de aplicación de la técnica de MALDI-IMS en secciones de tejido adiposo, que hemos validado posteriormente mediante estudios complementarios de LC-MS/MS. Brevemente, nuestro protocolo establece que, para contrarrestar las dificultades técnicas impuestas por la naturaleza del tejido adiposo, en la aplicación de la técnica de MALDI-IMS para el estudio de dicho tejido, las secciones deben ser depositadas sobre una cinta de carbón conductiva y posteriormente recubiertas con la matriz DHB como paso previo a su análisis.



Análisis del perfil lipídico del tejido adiposo en modelos de obesidad y resistencia a insulina.

Una vez establecido un protocolo óptimo para el análisis de tejidos grasos mediante MALDI-IMS, el siguiente objetivo era validar su uso en muestras con un elevado contenido de lípidos. Para ello, se usó un modelo de obesidad mórbida basado en una sobrenutrición postnatal por reducción de la camada, que se continúa posteriormente con un periodo de ingesta de una dieta alta en grasa (HFD), diseñado por el grupo del Dr. Tena-Sempere (Grupo GC10, IMIBIC) (Novelle et al., 2017; Sánchez-Garrido et al., 2015). Este modelo murino, ampliamente utilizado para estudiar los trastornos asociados a la obesidad en la pubertad, se caracteriza por un aumento significativo del peso y la grasa corporal, así como por la desregulación de la homeostasis glucídica (Sarker et al., 2019; Takumi et al., 2015; Ullah et al., 2017). Se han llevado a cabo numerosos estudios lipidómicos para evaluar la composición lipídica asociada a la obesidad en modelos murinos. Barber *et al.*, observaron que los niveles de LPCs en plasma de ratones disminuían mientras que los niveles de SMs y CERs aumentaron tras ser alimentados durante una semana con HFD. También se han descrito alteraciones en los niveles plasmáticos de algunas CERs, junto con una disminución de las concentraciones de PCs, PEs y PSs, sin observar cambios en SMs, en ratones con obesidad inducida por una dieta HFD más prolongada (14 semanas) (Eisinger et al., 2014). Las alteraciones inducidas por obesidad no sólo se reflejan en cambios en el lipidoma plasmático si no también en otros órganos normalmente afectados por el exceso de tejido adiposo, como el hígado (Hodson & Gunn, 2019). De esta forma, Nam *et al.* mostraron que los niveles hepáticos de PCs con grupos acilo relativamente largos estaban aumentados, en detrimento de los homólogos con grupos acilo cortos, en el grupo de ratas obesas alimentadas con HFD. Igualmente, se han observado niveles elevados de CERs y una disminución del contenido en SMs en el hígado de ratones ob/ob (Yetukuri et al., 2007). En la misma línea, en los estudios con ratones alimentados con HFD (Turner et al., 2013), se detectó un aumento en los niveles de diacilglicéridos (DGs) y CERs (20:0, 22:0, 18:0 y 20:0) en hígado. Curiosamente, en estos animales también se observó un aumento de CERs y SMs en tejido adiposo epididimal, indicando un patrón parcialmente común de cambios en el lipidoma entre grasa omental e hígado en obesidad.

En conjunto, e independientemente del tejido, estos resultados ponen en evidencia un efecto de la obesidad sobre el contenido en esfingolípidos y, en particular, un aumento de CERs, así como alteraciones en SMs. En este contexto, existen varios estudios que han implicado a las CERs en el desarrollo de las comorbilidades metabólicas de la obesidad, como diabetes y enfermedades cardiovasculares, lo que se ha asociado a su vez con el ambiente inflamatorio que ocurre en condiciones de exceso de tejido adiposo (de Mello et al., 2009; Ying et al., 2019). De hecho, la inhibición de la biosíntesis de CERs en ratones con obesidad genética o inducida por dieta mejora la resistencia a la insulina, diabetes, miocardiopatía, aterosclerosis y esteatohepatitis (G. Yang et al., 2009; Ying et al., 2019). En esta misma línea, se ha demostrado que la síntesis de SMs está asociada a obesidad y resistencia a insulina (Mitsutake et al., 2011).

En nuestros estudios, observamos que la combinación de los dos efectos obesogénicos, camada pequeña y HFD, producía cambios en la composición del lipidoma de las ratas obesas asociados al incremento de la concentración total de lípidos. Por otra parte, el análisis estadístico del perfil lipídico generado a partir de los estudios de MALDI-IMS del tejido adiposo mediante herramientas de *clustering* (PLS-DA y *Heatmap*), señaló la presencia de un marcado perfil de iones con expresión diferencial, permitiendo discriminar entre ambos grupos de acuerdo a la distribución de su lipidoma. Paradójicamente, se detectó un mayor número de iones significativos que disminuyeron su concentración en el grupo SL/HFD con respecto al grupo NL/LFD. Estos resultados sugieren que, a pesar del incremento en la concentración total de lípidos, cada familia de lípidos está regulada de manera independiente por mecanismos que probablemente se asocian a su función dentro del tejido.

El análisis de las muestras de tejido adiposo mediante MALDI-IMS, en combinación con los estudios de LC-MS/MS, nos permitió observar los cambios concretos del lipidoma del tejido adiposo subcutáneo murino en respuesta a obesidad. En concreto, observamos cambios significativos en la proporción de plasmalógenos constituidos por colina (LPC-Ps y PC-Ps). Esta familia de lípidos está involucrada en multitud de procesos biológicos, siendo relevantes su capacidad de regulación de la fluidez de la membrana y su papel protector frente al estrés oxidativo (Wallner y Schmitz, 2011; Brites et. Al., 2004).

Igualmente, se produjo un descenso, aunque no significativo en la concentración de lípidos estructurales de la membrana plasmática (PEs y SMs) y señalizadores (PIs). Se ha descrito que las PEs participan en la biogénesis y actividad de algunas proteínas (Becker et al., 2013; Bogdanov y Dowhan 1998, 1999), así como en la fosforilación oxidativa (Bottinger et al., 2012; Tasseva et al. al., 2013), autofagia (Ichimura et al., 2000), estabilidad mitocondrial (Birner et al., 2001) fusión de membranas (Verkleij et al., 1984; Steenbergen et al., 2005; Storey et al., 2001), y como precursores de otros lípidos (Bremer y Greenberg, 1961; Menon y Stevens, 1992). Por su parte, se ha descrito que, aparte de sus funciones estructurales asociadas a su presencia en balsas lipídicas, las SMs participan en la transducción de señales (Christopher R. Gault et al., 2010; Mitsutake & Igarashi, 2013; Slotte & Ramstedt, 2007). De igual forma, los PIs actúan como segundos mensajeros en los procesos de señalización celular que ocurren en la cara interna de las membranas celulares (Cockcroft & Carvou, 2007; Falkenburger et al., 2010).

En conjunto, estos resultados sugieren una desregulación de la composición de las membranas celulares en respuesta a obesidad, lo que podría afectar a funciones esenciales en la fisiología del adipocito, entre las que se incluirían procesos de señalización celular y el tráfico y metabolismo de lípidos. Esto estaría de acuerdo con la respuesta alterada a glucosa e insulina que observamos en los animales obesos analizados en nuestro estudio mediante los ensayos de GTT e ITT. Aunque estos análisis no demuestran directamente que los tipos celulares del tejido adiposo regulados por insulina, i.e., adipocitos, muestren una respuesta alterada a dicha hormona en nuestro modelo de animales obesos, es razonable proponer que ese es el caso, como demuestran numerosos estudios dirigidos previos llevados a cabo en modelos similares de obesidad, genética o inducida por dieta, incluidos roedores (Alli Shaik et al., 2016; Jimenez-Gomez et al., 2013).

Aunque no observamos cambios en el contenido total de SMs en el tejido adiposo obeso, en comparación con su homólogo de animales NL/LFD, nuestros estudios lipidómicos sí permitieron discriminar la presencia de ciertas formas de esfingomielinas que se expresaban de manera diferencial entre ambos grupos de estudio.

Concretamente, la esfingomielina SM(d18:0\_18:2) estaba aumentada en el tejido adiposo de ratas obesas. En este contexto, la posibilidad ofrecida por la técnica MALDI-IMS para determinar tanto la distribución espacial de los lípidos en cortes de tejido adiposo como su enriquecimiento o disminución en relación a la cantidad de masa grasa, nos sirvió para poder localizar los sitios del tejido en los que se acumulaba SM(d18:0\_18:2) en los animales obesos. De esta manera, observamos que dicha SM se acumulaba en áreas del tejido ocupadas mayoritariamente por adipocitos, lo cual podría indicar un enriquecimiento de SM(d18:0\_18:2) en las membranas de dichas células en animales obesos. No podemos asignar una función al isómero encontrado enriquecido en el tejido adiposo de estos animales, ya que no existe literatura específica al respecto, aunque, por ejemplo, en un estudio lipidómico dirigido para la búsqueda de factores de riesgo cardiovascular en la cohorte “*Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study*” (Huynh et al., 2019) se ha observado que la concentración plasmática de algunas especies de SMs similares, tales como SM(d18:2/14:0), presentan una asociación directa con el IMC. En conjunto, estos y nuestros datos sugieren que cambios en la composición de SMs, o de formas concretas de esta familia, podrían relacionarse con obesidad y enfermedad metabólica, quizás por su papel como componentes fundamentales de la membrana plasmática (Mitsutake & Igarashi, 2013). En este escenario, si SM(d18:0\_18:2) estuviera enriquecido en caveolas, cabría especular con un papel de este lípido en la señalización a insulina, dado el papel de estos subdominios como plataformas de señalización de factores de crecimiento (Lamaze et al., 2017). No obstante, se necesitan estudios lipidómicos dirigidos de caveolas, aisladas a partir de adipocitos procedentes de los distintos modelos animales, para poder confirmar si, como sugieren nuestros resultados, se producen cambios localizados de SM(d18:0\_18:2) u otras SMs y confirmar además si estos cambios potenciales pudieran interferir en la respuesta a insulina.

Además de cambios en SMs, nuestros estudios de MALDI-IMS demostraron que los plasmalógenos PC(O-16:0\_16:1) y PE(P-16:0\_20:0) redujeron sus niveles en el tejido adiposo de ratas obesas. Este descenso en los niveles de plasmalógenos ya se ha observado previamente en estudios lipidómicos de plasma de pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y, en mayor medida, en la enfermedad del hígado

graso no alcohólico (NAFLD) (Puri *et al.*, 2009). Notablemente, se han observado niveles de plasmalógenos aumentados en el hígado de ratones alimentados con HFD (Eisinger *et al.*, 2014). Aunque ambos modelos no son estrictamente comparables, demuestra la existencia de cambios en los plasmalógenos plasmáticos asociados a daño de un tejido metabólico, como el hígado. En esta línea, estudios recientes señalaron que el tratamiento de rescate con plasmalógenos es capaz de prevenir tanto NASH como NAFLD por medio del aumento de la actividad de PPAR $\alpha$ , un regulador transcripcional crítico en la oxidación de ácidos grasos (Jang *et al.*, 2017). Aunque PPAR $\alpha$  se expresa fundamentalmente y juega un importante papel en la regulación del metabolismo en hígado, estudios recientes muestran que también es importante en el tejido adiposo (Takahashi *et al.*, 2017). Así, los ratones que sobreexpresan PPAR $\alpha$  de forma selectiva en el tejido adiposo muestran un menor grado de inflamación de dicho tejido y mejoran su sensibilidad a insulina en condiciones de obesidad (Takahashi *et al.*, 2017). Cabe la posibilidad que los niveles disminuidos de PPAR $\alpha$  que se han observado en el tejido adiposo de animales obesos (Goto *et al.*, 2011) puedan influir en el menor contenido de plasmalógenos en general, y de PC(O-16:0\_16:1) y PE(P-16:0\_20:0) en particular, que observamos en el tejido adiposo de animales obesos en nuestro estudio. Teniendo en cuenta la implicación de los peroxisomas en la síntesis de plasmalógenos (Honsho & Fujiki, 2017; Wanders & Brites, 2010), este efecto podría estar mediado por una alteración de estos orgánulos en obesidad, dado el papel regulador de PPAR $\alpha$  sobre la oxidación de ácidos grasos en peroxisomas además de sobre su proliferación (Stienstra *et al.*, 2007). Notablemente, las imágenes obtenidas mediante MALDI-IMS permitieron determinar que la disminución de los plasmalógenos PC(O-16:0\_16:1) y PE(P-16:0\_20:0) se produce sobre todo en la fracción de estroma vascular (SVF) del tejido adiposo. Entre los componentes de esta fracción se incluyen las células madre mesenquimales y los preadipocitos responsables de la renovación del tejido (Bora & Majumdar, 2017; Ramakrishnan & Boyd, 2017). Curiosamente, la activación de PPAR $\alpha$  promueve la diferenciación de los adipocitos (Goto *et al.*, 2011), lo que apoyaría un papel, al menos parcial para el sistema peroxisomas/plasmalógenos en este proceso que, como se ha descrito por muchos autores, es disfuncional en el tejido adiposo en obesidad (Hammarstedt *et al.*, 2018; Vishvanath & Gupta, 2019). En la SVF también se localizan las células inmunes que infiltran el tejido adiposo: macrófagos, linfocitos y neutrófilos

(Elgazar-Carmon et al., 2008; Kintscher et al., 2008; Tchoukalova et al., 2004). Recientemente, se ha descrito que estas los plasmalógenos juegan un papel fundamental en el sistema inmune, ya que son un componente esencial de las membranas celulares de neutrófilos y macrófagos (Lodhi et al., 2012, 2015) e influyen de manera directa sobre el proceso de diferenciación de los monocitos en macrófagos (Wallner et al., 2014). En su conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que los plasmalógenos cumplen funciones vitales tanto en la dinámica de membranas celulares como en procesos clave de la fisiopatología de la obesidad y enfermedad (estrés oxidativo, inflamación), mediante su acción potencial sobre varios tipos celulares fundamentales del tejido adiposo. Finalmente, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la validez de nuestro método de MALDI-IMS para monitorizar los cambios que se producen en la distribución espacial de lípidos en respuesta al desarrollo de obesidad y resistencia a insulina.

### Análisis lipidómico del tejido adiposo en pacientes con obesidad y resistencia a insulina.

El objetivo de este estudio era la caracterización de la huella lipídica asociada al desarrollo de obesidad y resistencia a insulina en tejido adiposo humano. Estos individuos obesos fueron clasificados conforme a los criterios de la ADA en función a su perfil glucídico y grado de sensibilidad a insulina (Díaz-Ruiz *et al.*, 2015; Tam *et al.*, 2012). Gracias a los recientes avances en el campo de la lipidómica, se han ampliado los conocimientos acerca de los mecanismos de regulación de los lípidos en obesidad y enfermedad metabólica (Han, 2016). Los estudios lipidómicos realizados sobre muestras de suero de gemelos monocigóticos y discordantes en cuanto a obesidad, revelaron tanto un aumento de los niveles de LPCs como una disminución de los éter-fosfolípidos (Kirsi H. Pietiläinen *et al.*, 2007). En otro estudio se señaló que los niveles plasmáticos de dihidroceramidas, en particular las especies saturadas, se asociaban de manera positiva con el perímetro abdominal, mientras que las SMs, sobre todo monoinsaturadas, lo hacían de manera inversamente proporcional (Mamtani *et al.*, 2014). De igual forma, en un estudio con 1176 individuos jóvenes, se observó una asociación positiva entre los niveles plasmáticos de SMs y diacilfosfatidilcolina y el perímetro abdominal mientras que las LPCs lo hacían de manera negativa (Rauschert *et al.*, 2016). En la misma línea, se detectó una reducción en los niveles de LPCs presentes en el plasma de individuos obesos (Barber *et al.*, 2012). Por otra parte, el análisis comparativo del perfil lipidómico de pacientes delgados y obesos/con sobrepeso y diferente grado de sensibilidad a insulina, reveló un aumento en los niveles de TGs, DGs, ésteres de colesterol (CE), LPCs y LPC-Os en plasma, así como una reducción de los niveles de plasmalógenos en los sujetos obesos en comparación a los delgados (Tonks *et al.*, 2016). En este estudio también se detectaron niveles elevados de esfingolípidos compuestos por ácido esteárico (C18:0) en músculo esquelético. En conjunto, estos resultados apuntan a cambios esenciales en esfingolípidos, liso- y éter-fosfolípidos/plasmalógenos, plasmáticos o tisulares, asociados a obesidad. A nivel de tejido adiposo, se ha descrito en muestras de tejido adiposo epicárdico de mujeres obesas, que los niveles de PGs, principalmente PG (20:30\_20:3) y PG (22:5\_18:1) estaban aumentados mientras que se produjo un descenso en los niveles de plasmalógenos formados a partir de etanolamina (Scherer *et al.*, 2015). En otro estudio

con muestras de tejido adiposo subcutáneo de mujeres obesas, se observaron niveles elevados de TGs de cadena larga y CERs en el grupo de sujetos con hígado graso (Kolak et al., 2007). Adicionalmente, un estudio sobre la sensibilidad a insulina en mujeres obesas reveló un incremento en los niveles del gangliósido GM3, así como en la concentración de PEs en tejido adiposo omental (Wentworth et al., 2016). Por tanto, de forma similar a lo observado en plasma o en otros tejidos metabólicos, parece que el tejido adiposo sufre también cambios en el contenido de lípidos de fosfolípidos en general, y en particular de plasmalógenos y esfingolípidos, en condiciones de obesidad.

En nuestros estudios con obesos con diferente grado de sensibilidad a la insulina, el análisis lipídico del tejido adiposo subcutáneo reveló un incremento del contenido total de lípidos presentes en los grupos IR y T2D con respecto al grupo NG. Cabe destacar que este incremento fue sustancial para el grupo IR, a pesar de que no se detectaron diferencias significativas en cuanto a su peso corporal con respecto al grupo NG. A nivel global, los fosfolípidos de etanolamina (PEs) y de colina (PCs y PC-Os) fueron los componentes mayoritarios en todos los grupos estudiados mientras que los lisofosfolípidos de colina (LPC-Os y LPC-P), Pls y ceramidas constituían las familias minoritarias. Por otra parte, encontramos diferencias sustanciales en el perfil lipídico asociado a cada grupo ya que mientras que los glicerofosfolípidos en general y los éterfosfolípidos en particular, aumentaban su concentración, las SMs disminuían sus niveles en ambos grupos, IR y T2D, con respecto al grupo NG. Teniendo en cuenta las funciones celulares demostradas para estos lípidos (Santos & Preta, 2018), estos resultados sugieren que, durante el desarrollo de enfermedad metabólica en obesidad, se produce una remodelación de las membranas celulares del tejido adiposo, probablemente como medida adaptativa para facilitar la expansión del tejido, en particular de los adipocitos hipertróficos. Estos cambios en la membrana serían también útiles para contrarrestar el estrés mecánico al que están sometidas las células como consecuencia de la fibrosis que se desarrolla en el tejido, especialmente en los individuos obesos IR/T2D respecto a los NG (Guzmán-Ruiz et al., 2020).



A diferencia de los lípidos mencionados anteriormente, las CERs, aunque disminuyeron en condiciones de insulinoresistencia, aumentaron en el grupo de obesos diabéticos. Dada la implicación de las ceramidas en los procesos de apoptosis y señalización de la insulina, estos resultados sugieren que la desregulación de estas formas lipídicas podría ser un factor agravante en el desarrollo de enfermedad metabólica (Kayser et al., 2019; Sokolowska & Blachnio-Zabielska, 2019). Por otra parte, se observó un incremento significativo en los niveles de plasmalógenos (PE-Ps, PC-Ps y LPC-Ps) en los obesos con enfermedad metabólica, lo que podría explicarse como un mecanismo adaptativo frente al estrés oxidativo que se produce en condiciones de IR y T2D. De hecho, estudios de nuestro laboratorio de adipocitos aislados a partir de individuos obesos NG e IR han evidenciado el incremento de marcadores de estrés oxidativo, tanto a nivel de contenido de enzimas con actividad antioxidantes como de sus sustratos (*glutathione sintetasa*), en estas células (Díaz-Ruiz et al., 2015). Sin embargo, mientras que en adipocitos obesos NG, las defensas antioxidantes parecen ser suficientes para mantener la viabilidad celular, en los IR, este proceso está desequilibrado lo que, junto a la disfunción de la maquinaria de eliminación de proteínas dañadas o mal plegadas, el proteasoma (Rousseau & Bertolotti, 2018), provoca la acumulación de las mismas, provocando un efecto de proteotoxicidad que contribuye a la disfunción de los adipocitos (Díaz-Ruiz et al., 2015). Nuestros presentes resultados apoyan la idea de que, como ocurre respecto al estrés oxidativo, el perfil lipídico del tejido adiposo obeso NG, que muy probablemente difieren del que pueden encontrarse en individuos delgados, se asocia a una respuesta adaptativa de defensa celular frente a los insultos propios de la obesidad mientras que los cambios que puedan ocurrir en la transición NG a IR podrían reflejar la acumulación de lípidos con efectos tóxicos (o, alternatively, la falta de lípidos con efectos protectores) en el tejido adiposo.

En esta línea, el análisis de los resultados obtenidos mediante MALDI-IMS permitió discriminar diferencias en la huella lipídica asociada a cada uno de los grupos estudiados, mostrando un patrón de progresión fenotípica desde el grupo NG hasta el grupo T2D. A pesar de que el modelo PLS-DA generado en base a su perfil lipídico se considera altamente predictivo, observamos un solapamiento en la zona de transición entre los grupos NG e IR. Este efecto podría deberse a que estos pacientes presentan

características discriminatorias adicionales que no han sido contempladas en los criterios de diagnóstico de la ADA utilizados en nuestro estudio, y que los situarían en una fase de transición entre grupos. De hecho, no se detectaron iones con expresión diferencial significativa y exclusiva del grupo IR, lo que conllevó a una polarización en la distribución del perfil lipídico de los grupos NG e IR con respecto al grupo T2D. Así, el análisis comparativo entre grupos reveló un mayor número de especies significativas en la comparativa NG-T2D y IR-T2D con respecto a la transición NG-IR. No obstante, una vez anotados los lípidos con diferencias significativas, sí encontramos especies discriminativas entre los tres grupos. Concretamente, en obesos IR y T2D, comparados con los obesos NG, se detectaron cambios en básicamente todas las familias de lípidos pertenecientes a esos grupos. Además, se detectó un significativo incremento en los niveles de LPCs, LPEs y PAs en el grupo de IR con respecto al grupo NG. Mientras que la desregulación de formas liso se ha correlacionado con procesos inflamatorios en obesidad (del Bas et al., 2016), se ha descrito que el PA ejerce un papel muy importante en la señalización de insulina a través de los receptores mTOR (Fang et al., 2001; C. Zhang et al., 2012). Por su parte, la comparativa IR-T2D reveló diferencias significativas en los niveles de concentración de éter-fosfolípidos, glicerofosfolípidos y ceramidas, lo que sugeriría un papel para estos lípidos en el empeoramiento de la enfermedad metabólica asociada a obesidad. De nuevo, estas familias de lípidos aparecen como marcadores del tejido adiposo en relación al desarrollo de enfermedad metabólica, como habíamos observado previamente en modelos murinos (delgados vs. obesos IR).

Atendiendo a estos resultados, elegimos algunos ejemplos representativos de lípidos para, como en el caso del modelo murino, observar si había una distribución diferencial de los mismos en los tejidos, añadido a su variación cuantitativa detectada por MALDI-IMS. De esta manera, se observó que la esfingomielina SM(d18:1\_22:0), con niveles más elevados en los grupos IR y T2D, se acumulaban de manera preferente en regiones ocupadas por adipocitos. Estos resultados van en consonancia con estudios previos, en los que se relacionaba un exceso de esfingomielinas con el desarrollo de resistencia a insulina (Li et al., 2011) y enfermedad metabólica (Russo et al., 2013; Sui et al., 2019). Por el contrario, los éter-fosfolípidos presentaban un patrón de distribución más variable en el tejido, a excepción de la especie PC(P-16:0\_20:5), cuya concentración fue

menor en la comparativa NG vs. IR, pero mayor en T2D, y se correlacionaba de manera directa con la fracción de estroma vascular en el grupo NG. Dado que se ha descrito que los plasmalógenos intervienen en una multitud de procesos biológicos (Nancy E. Braverman & Ann B. Moser, 2012; Dean & Lodhi, 2018), esta distribución diferencial con respecto a otras especies lipídicas de su misma familia podría sugerir una función más específica dentro del tejido adiposo.

Estos resultados sugieren, en su conjunto, que las condiciones fisiopatológicas que subyacen en el desarrollo de obesidad y resistencia a insulina o diabetes tipo 2, provocan una modificación sustancial del lipidoma asociado al tejido adiposo, afectando de manera específica tanto a la concentración de especies de lipídicas como a su distribución espacial a lo largo del tejido. De igual forma, estos resultados ponen de manifiesto que a pesar de la complejidad y heterogeneidad presente en aquellos estudios que emplean muestras biológicas de origen humano, el uso de nuestro protocolo optimizado de MALDI-IMS en muestras de tejido adiposo fue de gran utilidad para predecir el estado fisiopatológico de cada grupo de pacientes en base a su perfil lipídico. Es necesario indicar que, aun con esta nueva información generada sobre el lipidoma del tejido adiposo, que permite sugerir a algunas especies lipídicas como marcadores de obesidad asociada a enfermedad metabólica, son necesarios estudios adicionales que permitan determinar sus funciones específicas y la regulación de su biosíntesis. Desafortunadamente, aún se desconocen en su totalidad las rutas relacionadas con el metabolismo de las especies lipídicas concretas, aunque sí se ha avanzado en el conocimiento de las enzimas generales que participan en la biosíntesis de ciertas familias, como las que hemos encontrado que presentan expresión diferencial en obesidad e IR, esfingolípidos y éter-fosfolípidos.

Por ello, como continuación a los estudios de lipidómica, decidimos analizar la regulación en adipocitos de la expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo de estas familias de lípidos, como se discute en el siguiente apartado.

**Análisis de expresión de las enzimas implicadas en las rutas de biosíntesis de esfingolípidos y éter-fosfolípidos en modelos murinos y humanos.**

Las condiciones presentes durante el transcurso de la obesidad y enfermedad metabólica inducen en los adipocitos diferentes procesos de estrés celular que afectan a diferentes orgánulos, como estrés oxidativo (mitocondrias y peroxisomas) o estrés del retículo endoplásmico (Manna & Jain, 2015; Matsuda & Shimomura, 2013; Pagliassotti et al., 2016). De hecho, está claramente establecido que la disfunción de los adipocitos en obesidad es el resultado de un proceso multifactorial en el que intervienen diversos procesos patogénicos, desde inflamación a fibrosis o hipoxia (Rutkovski et al., 2015). En la actualidad los modelos de adipocitos de resistencia a insulina *in vitro* son utilizados para diseccionar los procesos celulares alterados en estas células en situaciones *in vivo* (Lo et al., 2013; Diaz-Ruiz et al., 2015; Guzmán-Ruiz et al., 2020). En particular, en el laboratorio se han validado dos modelos de adipocitos que mimetizan las condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia y de inflamación presentes en obesos IR (modelo HGHI y modelo de exposición a TNF $\alpha$ , respectivamente) (Diaz-Ruiz et al., 2015; Guzmán-Ruiz et al., 2020). De acuerdo con esto, usamos estos modelos para determinar su impacto sobre la expresión de las enzimas relacionadas con la biosíntesis de esfingolípidos y éter-fosfolípidos, además de estudiar sus posibles variaciones durante el proceso de diferenciación celular.

En relación a la biosíntesis de éter-lípidos, nuestros estudios mostraron un patrón temporal diferencial, asociado a los dos orgánulos que intervienen en este proceso: peroxisomas y retículo endoplásmico (Nancy E. Braverman & Ann B. Moser, 2012). En este sentido, observamos que tanto la alquil-DHAP sintasa como la enzima dihidroxiacetonafofato O-aciltransferasa (DHAPAT), que catalizan los primeros pasos en la biosíntesis de éter-lípidos, i.e. la formación de alquil-DHAP a partir de acil-DHAP o de ácidos grasos, respectivamente, mostraban niveles más elevados al inicio del proceso de diferenciación de los adipocitos. Curiosamente, estas enzimas están localizadas en los peroxisomas, en los que se encuentran formando heterodímeros (Wanders y Waterham, 2006), sugiriendo una participación activa de estos orgánulos en el proceso de diferenciación. De hecho, se ha demostrado que la proliferación de los peroxisomas

es crítica para promover la adipogénesis (Liu et al., 2019). Sin embargo, las enzimas del retículo endoplásmico que intervienen en la síntesis de esta familia de lípidos, AGPAT3, CEPT1 y CHPT1, mostraron niveles incrementados de expresión en fases más tardías. En conjunto, estos resultados sugieren un ajuste temporal en la biosíntesis de éter-fosfolípidos, en las que las primeras fases, asociadas a peroxisomas, ocurrirían en etapas tempranas de la adipogénesis (i.e., al inicio de la acumulación de lípidos en gotas lipídicas), mientras que la segunda, asociada a retículo endoplásmico, tendría lugar a continuación, una vez que el metabolito intermedio de esta ruta, 1-O-alkil-2-hidroxi-sn-GPA es transferido desde el peroxisoma hasta el retículo (Fig.51).

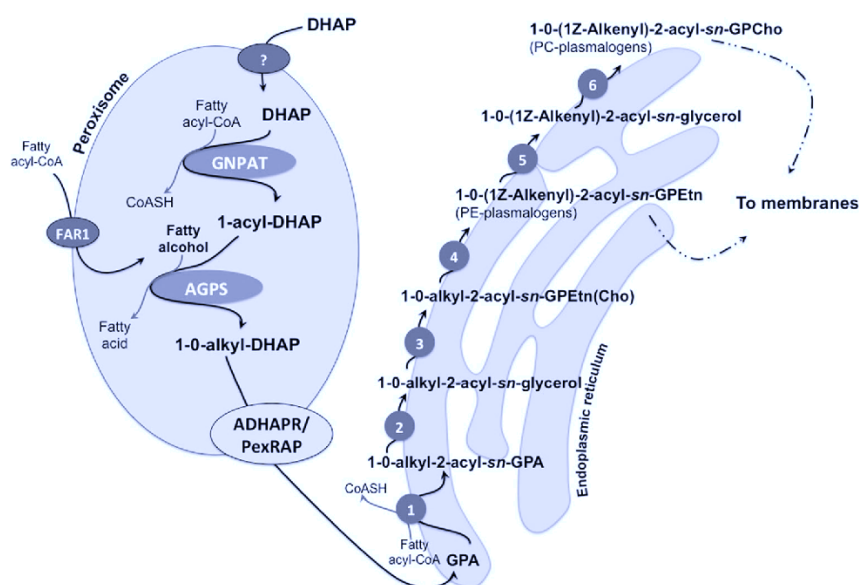


Figura 51. Esquema representativo de la biosíntesis secuencial de plasmalógenos en el peroxisoma y retículo endoplasmático. Tomado de Malheiro *et al.*, 2014.

Esta transferencia podría ocurrir en los puntos de contacto directo que se ha demostrado que existen entre los peroxisomas y las membranas del retículo endoplásmico, las PAMs (*peroxisome-associated ER membranes*), que se ha propuesto que sirven como puentes para el intercambio de metabolitos (Islinger et al., 2015). Teniendo en cuenta estas observaciones, parece razonable proponer que condiciones que alteren la propia estructura y función de estos orgánulos, como ocurre en los adipocitos en obesidad (Khan & Wang, 2014; Liu et al., 2019), podrían relacionarse con una biosíntesis alterada de éter-fosfolípidos. Esta propuesta estaría de acuerdo con los resultados obtenidos a partir de los modelos de resistencia a insulina *in vitro*, exposición a HGHI y TNF $\alpha$ , que indujeron una reducción de la expresión de prácticamente todas las

enzimas que participan en la biosíntesis de éter-fosfolípidos, tanto en peroxisomas como en el RE, sobre todo en respuesta a la citoquina proinflamatoria. En conjunto, estos y nuestros resultados de lipidómica, en tejido adiposo humano y murino, sugieren que la hiperglucemia/hiperinsulinemia y la inflamación que sufre el tejido en obesidad podría contribuir, mediante su efecto sobre los orgánulos celulares del adipocito, a una desregulación en la producción de éter-fosfolípidos, afectando tanto a la regulación de la fluidez de la membrana plasmática del adipocito como a su capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo (Wallner y Schmitz, 2011; Brites et. Al., 2004).

Adicionalmente, se ha descrito que los marcadores inflamatorios y de estrés del RE se encuentran elevados en pacientes que sufren obesidad (Pagliassotti et al., 2016). Es por ello por lo que, nos propusimos analizar la expresión proteica de algunos de estos marcadores con el objetivo de evaluar tanto el estado funcional del adipocito durante la adipogénesis como en los modelos *in vitro* de obesidad y resistencia a insulina. Los resultados mostraron que todas las enzimas, excepto CHOP que alcanza su pico de activación a día 6, elevaron de manera significativa sus niveles de expresión a partir del día 3 de diferenciación y lo mantuvieron hasta etapas tardías. De la misma manera, el análisis de los resultados en modelos nos permitió observar que el tratamiento con HGHI producía un descenso significativo de la enzima BiP y un aumento de GSS, pero no tuvo efecto alguno sobre el resto de las enzimas. Por su parte, la exposición con TNF $\alpha$  provocó una reducción de los niveles de expresión de GSS, catalasa y adiponectina mientras que BiP y CHOP permanecieron invariables. En conclusión, estos resultados sugieren que las condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia afectaron en mayor medida al estrés del retículo endoplasmático (provocando una disminución de los niveles de BiP) y provocaron la puesta en marcha de un proceso de estrés oxidativo, como indica el aumento de los niveles proteicos de la enzima GSS. Asimismo, la exposición crónica a un ambiente proinflamatorio afectó de manera significativa a la expresión de catalasa, indicando igualmente una alteración de las defensas antioxidantes de los adipocitos y una disminución de la adiponectina, lo que es indicativo de una disfunción de los adipocitos inducida por TNF $\alpha$ .

Por otra parte, la biosíntesis de esfingolípidos requiere de un sofisticado mecanismo de regulación entre orgánulos y membranas celulares (Hannun & Obeid, 2018). Mientras que las esfingomielinas se producen en el aparato de Golgi o la membrana plasmática, las ceramidas pueden producirse a nivel intracelular en el RE, ser recicladas por mediación de los endolisosomas o sintetizarse en la membrana plasmática (Hannun & Obeid, 2018).

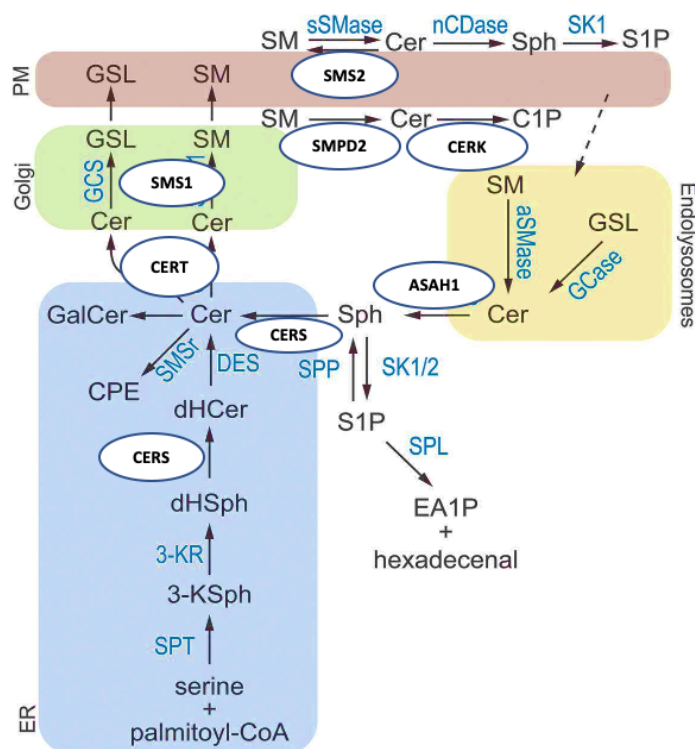


Figura 52. Esquema representativo de la biosíntesis de esfingolípidos. Adaptado de Mullen *et al.* (2016)

Además, se ha descrito que los esfingolípidos no sólo tienen funciones estructurales en las membranas biológicas y de señalización celular, sino que además pueden estar implicados en el desarrollo de resistencia a la insulina (Cowart *et al.*, 2011). En nuestros resultados se observaba como la biosíntesis de ceramidas disminuía a nivel intracelular, pero aumentaba en la membrana plasmática conforme avanzaba la diferenciación celular. Con respecto a las enzimas encargadas de la síntesis de esfingomielinas, éstas experimentaron un patrón de activación significativa a partir de día 3 de diferenciación, aunque la producción de esfingomielina intracelular decaía drásticamente en días sucesivos. En conjunto, estos resultados indican que la mayoría de las enzimas experimentaron un cambio en sus niveles de expresión en el momento en el cual las células en cultivo comienzan a mostrar gotas lipídicas. Asimismo, también muestran que

las enzimas alcanzaron o bien su pico máximo de expresión o bien una disminución significativa de la expresión proteica en etapas tardías de la diferenciación, cuando el adipocito ha completado su maduración y, en consecuencia, se produce una mayor acumulación intracelular de lípidos. De igual forma, en los resultados obtenidos a partir de los modelos *in vitro* de resistencia a insulina, observamos que el tratamiento con HGHI favorecía la síntesis de esfingomielinas a nivel intracelular y de ceramidas en la membrana plasmática, mientras que la exposición a ambiente proinflamatorio provocaba un descenso generalizado de todas las enzimas estudiadas.

En conclusión, estos resultados sugieren que cada ruta de biosíntesis de lípidos se ve afectada de un modo distinto por las condiciones patofisiológicas que cursan con obesidad y desarrollo de resistencia a insulina.







CONCLUSIONES



1. La aplicación de MALDI-Imaging para el análisis lipidómico del tejido adiposo requiere de un procedimiento de optimización, determinado por el alto enriquecimiento en lípidos del tejido, de parámetros críticos como la superficie de deposición de la muestra o el método de aplicación de la matriz de ionización.
2. La composición del tejido adiposo sufre variaciones cuantitativas y cualitativas en su perfil lipídico, y su distribución espacial se ve alterada durante el desarrollo de enfermedad metabólica asociada a obesidad.
3. La zonación de lípidos en tejido adiposo mostró una patrón de asociación entre el estroma vascular y ciertas formas de éter-fosfolípidos mientras que las esfingomielinas se correlacionaron mayoritariamente con regiones enriquecidas en adipocitos.
4. La transición de normoglucemia a resistencia a insulina y/o diabetes de tipo 2 en pacientes obesos está asociada a cambios en la expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de esfingolípidos y fosfolípidos que podrían conducir a la disfunción de las membranas celulares.
5. Los esfingolípidos y los fosfolípidos son importantes para el correcto desarrollo de los adipocitos y su desregulación puede favorecer el desarrollo de resistencia a insulina.
6. Las distintas condiciones patofisiológicas que cursan con obesidad y desarrollo de resistencia a insulina (inflamación e hiperglucemia/hiperinsulinemia) afectan de manera diferencial a las rutas de biosíntesis de lípidos en adipocitos.
7. En los adipocitos, existe un diseño temporal preciso de activación de la biosíntesis de esfingolípidos y éter-fosfolípidos que es específico de los compartimentos intracelulares implicados, retículo endoplásmico y peroxisomas, y que está definido por la regulación de la expresión génica de las enzimas propias de cada compartimento.



## CONCLUSIONS





1. The application of MALDI-Imaging for lipidomic analysis of adipose tissue requires an optimization procedure, determined by the high lipid enrichment of the tissue, of critical parameters such as the sample deposition surface or the method of application of the ionization matrix.
2. The composition of adipose tissue undergoes quantitative and qualitative variations in its lipid profile and its spatial distribution is altered during the development of metabolic disease associated with obesity.
3. Lipid zonation in adipose tissue showed a pattern of association between vascular stroma and certain forms of ether-phospholipids while sphingomyelins were mostly correlated with regions enriched in adipocytes.
4. The transition from normoglycemia to insulin resistance and/or type 2 diabetes in obese patients is associated with changes in enzyme expression related to sphingolipids and phospholipids synthesis that could lead to cell membrane dysfunction.
5. Sphingolipids and phospholipids are important for the proper development of adipocytes and their dysregulation can promote the development of insulin resistance.
6. The different pathophysiological conditions that occur with obesity and the development of insulin resistance (inflammation and hyperglycemia/hyperinsulinemia) differentially affect the lipid biosynthesis pathways in adipocytes.
7. In adipocytes, there is a precise temporal design of activation of the biosynthesis of sphingolipids and ether-phospholipids that is specific to the intracellular compartments involved, endoplasmic reticulum and peroxisomes, and which is defined by the regulation of gene expression of the enzymes specific to each compartment.



## BIBLIOGRAFÍA



- A. Saleh, A., Z. Eid, Y., A. Ebeid, T., Kamizono, T., Ohtsuka, A., & Hayashi, K. (2011). Effects of Feeding *Aspergillus Awamori* and *Aspergillus Niger* on Growth Performance and Meat Quality in Broiler Chickens. *The Journal of Poultry Science*, 48(3), 201-206. <https://doi.org/10.2141/jpsa.011019>
- Aerni, H.-R., Cornett, D. S., & Caprioli, R. M. (2006, 2006/02/01). Automated Acoustic Matrix Deposition for MALDI Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, 78(3), 827-834. <https://doi.org/10.1021/ac051534r>
- Ahmad, B., Serpell, C. J., Fong, I. L., & Wong, E. H. (2020, 2020-May-08). Molecular Mechanisms of Adipogenesis: The Anti-adipogenic Role of AMP-Activated Protein Kinase [Review]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(76). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00076>
- Al-Sulaiti, H., Diboun, I., Banu, S., Al-Emadi, M., Amani, P., Harvey, T. M., Dömling, A. S., Latiff, A., & Elrayess, M. A. (2018, 2018/06/26). Triglyceride profiling in adipose tissues from obese insulin sensitive, insulin resistant and type 2 diabetes mellitus individuals. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1548-x>
- Aleksandrova, K., Egea Rodrigues, C., Floegel, A., & Ahrens, W. (2020). Omics Biomarkers in Obesity: Novel Etiological Insights and Targets for Precision Prevention. *Current obesity reports*, 9(3), 219-230. <https://doi.org/10.1007/s13679-020-00393-y>
- Alli Shaik, A., Qiu, B., Wee, S., Choi, H., Gunaratne, J., & Tergaonkar, V. (2016, 2016/05/16). Phosphoprotein network analysis of white adipose tissues unveils deregulated pathways in response to high-fat diet. *Scientific Reports*, 6(1), 25844. <https://doi.org/10.1038/srep25844>
- Ameer, F., Scanduzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., & Zaidi, N. (2014). *De novo* lipogenesis in health and disease. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 63(7), 895-902. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.04.003>
- Amoretti, M., Amsler, C., Bonomi, G., Bouchta, A., Bowe, P., Carraro, C., Cesar, C. L., Charlton, M., Collier, M. J. T., Doser, M., Filippini, V., Fine, K. S., Fontana, A., Fujiwara, M. C., Funakoshi, R., Genova, P., Hangst, J. S., Hayano, R. S., Holzschneider, M. H., Jørgensen, L. V., Lagomarsino, V., Landua, R., Lindelöf, D., Rizzini, E. L., Macrì, M., Madsen, N., Manuzio, G., Marchesotti, M., Montagna, P., Pruys, H., Regenfus, C., Riedler, P., Rochet, J., Rotondi, A., Rouleau, G., Testera, G., Variola, A., Watson, T. L., & van der Werf, D. P. (2002, 2002/10/01). Production and detection of cold antihydrogen atoms. *Nature*, 419(6906), 456-459. <https://doi.org/10.1038/nature01096>
- Anand, B. K., & Brobeck, J. R. (1951). Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *The Yale journal of biology and medicine*, 24(2), 123-140. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14901884>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2599116/>

- Anderson, D. M. G., Floyd, K. A., Barnes, S., Clark, J. M., Clark, J. I., McHaourab, H., & Schey, K. L. (2015, 2015/03/01). A method to prevent protein delocalization in imaging mass spectrometry of non-adherent tissues: application to small vertebrate lens imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(8), 2311-2320. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8489-5>
- Angel, P. M., Spraggins, J. M., Baldwin, H. S., & Caprioli, R. (2012, 2012/02/07). Enhanced Sensitivity for High Spatial Resolution Lipid Analysis by Negative Ion Mode Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Imaging Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 84(3), 1557-1564. <https://doi.org/10.1021/ac202383m>
- Appleton, S. L., Seaborn, C. J., Visvanathan, R., Hill, C. L., Gill, T. K., Taylor, A. W., & Adams, R. J. (2013, Aug). Diabetes and cardiovascular disease outcomes in the metabolically healthy obese phenotype: a cohort study. *Diabetes Care*, 36(8), 2388-2394. <https://doi.org/10.2337/dc12-1971>
- Arner, E., Westermark, P. O., Spalding, K. L., Britton, T., Rydén, M., Frisén, J., Bernard, S., & Arner, P. (2010, Jan). Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*, 59(1), 105-109. <https://doi.org/10.2337/db09-0942>
- Assimakopoulos-Jeannet, F., Brichard, S., Rencurel, F., Cusin, I., & Jeanrenaud, B. (1995, 1995/02/01/). In vivo effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissues. *Metabolism*, 44(2), 228-233. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0026-0495\(95\)90270-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0026-0495(95)90270-8)
- Barber, M. N., Risis, S., Yang, C., Meikle, P. J., Staples, M., Febbraio, M. A., & Bruce, C. R. (2012). Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes. *PLOS ONE*, 7(7), e41456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041456>
- Blanksby, S. J., & Mitchell, T. W. (2010). Advances in Mass Spectrometry for Lipidomics. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 3(1), 433-465. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.111808.073705>
- Blanksby, S. J., & Mitchell, T. W. (2010). Advances in mass spectrometry for lipidomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 3, 433-465. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.111808.073705>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959, Aug). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Blom, T., Somerharju, P., & Ikonen, E. (2011, Aug 1). Synthesis and biosynthetic trafficking of membrane lipids. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(8), a004713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004713>

- Blüher, M. (2010, Feb). The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese individuals. *Curr Opin Lipidol*, 21(1), 38-43. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283346ccc>
- Blüher, M. (2014, Dec). Are metabolically healthy obese individuals really healthy? *Eur J Endocrinol*, 171(6), R209-219. <https://doi.org/10.1530/eje-14-0540>
- Blüher, M. (2019, 2019/05/01). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(5), 288-298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>
- Bora, P., & Majumdar, A. S. (2017, 2017/06/15). Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0598-y>
- Börjeson, M. (1976, May). The aetiology of obesity in children. A study of 101 twin pairs. *Acta Paediatr Scand*, 65(3), 279-287. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1976.tb04887.x>
- Boutens, L., & Stienstra, R. (2016, 2016/05/01). Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia*, 59(5), 879-894. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3904-9>
- Brasaemle, D. L. (2007, Dec). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res*, 48(12), 2547-2559. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700014-JLR200>
- Braverman, N. E., & Moser, A. B. (2012, 2012/09/01/). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1442-1452. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.008>
- Braverman, N. E., & Moser, A. B. (2012, Sep). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1822(9), 1442-1452. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.008>
- Brites, P., Waterham, H. R., & Wanders, R. J. (2004, Mar 22). Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1636(2-3), 219-231. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2003.12.010>
- Brochu, M., Tchernof, A., Dionne, I. J., Sites, C. K., Eltabbakh, G. H., Sims, E. A. H., & Poehlman, E. T. (2001). What Are the Physical Characteristics Associated with a Normal Metabolic Profile Despite a High Level of Obesity in Postmenopausal Women?1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(3), 1020-1025. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.3.7365>

- Buchberger, A. R., DeLaney, K., Johnson, J., & Li, L. (2018, 2018/01/02). Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights. *Analytical Chemistry*, 90(1), 240-265. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04733>
- Budzikiewicz, H., & Grigsby, R. D. (2006). Mass spectrometry and isotopes: A century of research and discussion. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(1), 146-157. <https://doi.org/10.1002/mas.20061>
- Cajka, T., & Fiehn, O. (2014, Oct 1). Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends Analyt Chem*, 61, 192-206. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.017>
- Caldwell, R. L., & Caprioli, R. M. (2005, Apr). Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications. *Mol Cell Proteomics*, 4(4), 394-401. <https://doi.org/10.1074/mcp.R500006-MCP200>
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004, Jan). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84(1), 277-359. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>
- Carmen, G. Y., & Víctor, S. M. (2006, Apr). Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal*, 18(4), 401-408. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.08.009>
- Carobbio, S., Pellegrinelli, V., & Vidal-Puig, A. (2017). Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol*, 960, 161-196. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_7)
- Chang, Y., Ryu, S., Suh, B. S., Yun, K. E., Kim, C. W., & Cho, S. I. (2012, 2012/09/01). Impact of BMI on the incidence of metabolic abnormalities in metabolically healthy men. *International Journal of Obesity*, 36(9), 1187-1194. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.247>
- Chaurasia, B., & Summers, S. A. (2015, 2015/10/01/). Ceramides – Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(10), 538-550. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.006>
- Chondronikola, M., Volpi, E., Børshheim, E., Porter, C., Saraf, M. K., Annamalai, P., Yfanti, C., Chao, T., Wong, D., Shinoda, K., Labbé, S. M., Hurren, N. M., Cesani, F., Kajimura, S., & Sidossis, L. S. (2016). Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans. *Cell metabolism*, 23(6), 1200-1206. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.029>
- Chooi, Y. C., Ding, C., & Magkos, F. (2019a, 2019/03/01/). The epidemiology of obesity. *Metabolism*, 92, 6-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005>



- Chooi, Y. C., Ding, C., & Magkos, F. (2019b). The epidemiology of obesity. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 92, 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005>
- Christiansen, T., Richelsen, B., & Bruun, J. M. (2005, 2005/01/01). Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *International Journal of Obesity*, 29(1), 146-150. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802839>
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2005, Nov). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*, 46(11), 2347-2355. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200>
- Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J. M., Basdevant, A., Bougnères, P., Lebouc, Y., Froguel, P., & Guy-Grand, B. (1998, Mar 26). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, 392(6674), 398-401. <https://doi.org/10.1038/32911>
- Cobice, D. F., Goodwin, R. J. A., Andren, P. E., Nilsson, A., Mackay, C. L., & Andrew, R. (2015). Future technology insight: mass spectrometry imaging as a tool in drug research and development. *British Journal of Pharmacology*, 172(13), 3266-3283. <https://doi.org/10.1111/bph.13135>
- Cockcroft, S., & Carvou, N. (2007, 2007/06/01/). Biochemical and biological functions of class I phosphatidylinositol transfer proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(6), 677-691. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.03.009>
- Coleman, D. L., & Hummel, K. P. (1969, Nov). Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am J Physiol*, 217(5), 1298-1304. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1969.217.5.1298>
- Collaboration, N. R. F. (2016, Apr 2). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*, 387(10026), 1377-1396. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)30054-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30054-x)
- Collins, J. M., Neville, M. J., Pinnick, K. E., Hodson, L., Ruyter, B., van Dijk, T. H., Reijngoud, D.-J., Fielding, M. D., & Frayn, K. N. (2011, September 1, 2011). De novo lipogenesis in the differentiating human adipocyte can provide all fatty acids necessary for maturation. *Journal of Lipid Research*, 52(9), 1683-1692. <https://doi.org/10.1194/jlr.M012195>

- Cornett, D. S., Reyzer, M. L., Chaurand, P., & Caprioli, R. M. (2007, 2007/10/01). MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems. *Nature Methods*, 4(10), 828-833. <https://doi.org/10.1038/nmeth1094>
- Cowart, L. A. (2009, Jan). Sphingolipids: players in the pathology of metabolic disease. *Trends Endocrinol Metab*, 20(1), 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.09.004>
- Crewe, C., An, Y. A., & Scherer, P. E. (2017, Jan 3). The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *J Clin Invest*, 127(1), 74-82. <https://doi.org/10.1172/jci88883>
- Curat, C. A., Miranville, A., Sengenès, C., Diehl, M., Tonus, C., Busse, R., & Bouloumié, A. (2004). From Blood Monocytes to Adipose Tissue-Resident Macrophages. *Diabetes*, 53(5), 1285. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.5.1285>
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y.-H., Doria, A., Kolodny, G. M., & Kahn, C. R. (2009). Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *New England Journal of Medicine*, 360(15), 1509-1517. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810780>
- Czech, M. P., Tencerova, M., Pedersen, D. J., & Aouadi, M. (2013, May). Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia*, 56(5), 949-964. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2869-1>
- Czernichow, S., Kengne, A.-P., Stamatakis, E., Hamer, M., & Batty, G. D. (2011). Body mass index, waist circumference and waist-hip ratio: which is the better discriminator of cardiovascular disease mortality risk? Evidence from an individual-participant meta-analysis of 82 864 participants from nine cohort studies. *Obesity Reviews*, 12(9), 680-687. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2011.00879.x>
- D'Angelo, G., Capasso, S., Sticco, L., & Russo, D. (2013). Glycosphingolipids: synthesis and functions. *The FEBS Journal*, 280(24), 6338-6353. <https://doi.org/10.1111/febs.12559>
- Danforth, E., Jr. (2000, Sep). Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? *Nat Genet*, 26(1), 13. <https://doi.org/10.1038/79111>
- Datta, R., Podolsky, M. J., & Atabai, K. (2018, 10/04/). Fat fibrosis: friend or foe? *JCI Insight*, 3(19). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122289>
- de Mello, V. D. F., Lankinen, M., Schwab, U., Kolehmainen, M., Lehto, S., Seppänen-Laakso, T., Orešič, M., Pulkkinen, L., Uusitupa, M., & Erkkilä, A. T. (2009, 2009/12/01). Link between plasma ceramides, inflammation and insulin resistance: association with serum IL-6 concentration in patients with coronary

- heart disease. *Diabetologia*, 52(12), 2612-2615.  
<https://doi.org/10.1007/s00125-009-1482-9>
- Dean, J. M., & Lodhi, I. J. (2018, 2018/02/01). Structural and functional roles of ether lipids. *Protein & Cell*, 9(2), 196-206. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0423-5>
- del Bas, J. M., Caimari, A., Rodriguez-Naranjo, M. I., Childs, C. E., Paras Chavez, C., West, A. L., Miles, E. A., Arola, L., & Calder, P. C. (2016). Impairment of lysophospholipid metabolism in obesity: altered plasma profile and desensitization to the modulatory properties of n-3 polyunsaturated fatty acids in a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 104(2), 266-279.  
<https://doi.org/10.3945/ajcn.116.130872>
- Díaz-Ruiz, A., Guzmán-Ruiz, R., Moreno, N. R., García-Rios, A., Delgado-Casado, N., Membrives, A., Túnez, I., El Bekay, R., Fernández-Real, J. M., Tovar, S., Diéguez, C., Tinahones, F. J., Vázquez-Martínez, R., López-Miranda, J., & Malagón, M. M. (2015, 2015/09/01). Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(7), 597-612.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2014.5939>
- Díaz-Ruiz, A., Guzmán-Ruiz, R., Moreno, N. R., García-Rios, A., Delgado-Casado, N., Membrives, A., Túnez, I., El Bekay, R., Fernández-Real, J. M., Tovar, S., Diéguez, C., Tinahones, F. J., Vázquez-Martínez, R., López-Miranda, J., & Malagón, M. M. (2015, Sep 1). Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Antioxid Redox Signal*, 23(7), 597-612. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5939>
- Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., & Raptis, S. A. (2011, Aug). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract*, 93 Suppl 1, S52-59.  
[https://doi.org/10.1016/s0168-8227\(11\)70014-6](https://doi.org/10.1016/s0168-8227(11)70014-6)
- DiSpirito, J. R., & Mathis, D. (2015, Sep). Immunological contributions to adipose tissue homeostasis. *Semin Immunol*, 27(5), 315-321.  
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.10.005>
- Divoux, A., & Clément, K. (2011, May). Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obes Rev*, 12(5), e494-503.  
<https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2010.00811.x>
- Dufresne, M., Masson, J.-F., & Chaurand, P. (2016, 2016/06/07). Sodium-Doped Gold-Assisted Laser Desorption Ionization for Enhanced Imaging Mass Spectrometry of Triacylglycerols from Thin Tissue Sections. *Analytical Chemistry*, 88(11), 6018-6025. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01141>
- Dutheil, F., Gordon, B. A., Naughton, G., Crendal, E., Courteix, D., Chaplais, E., Thivel, D., Lac, G., & Benson, A. C. (2018). Cardiovascular risk of adipokines: a review.

- Journal of International Medical Research*, 46(6), 2082-2095.  
<https://doi.org/10.1177/0300060517706578>
- Eisinger, K., Liebisch, G., Schmitz, G., Aslanidis, C., Krautbauer, S., & Buechler, C. (2014, Feb 20). Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice. *Int J Mol Sci*, 15(2), 2991-3002. <https://doi.org/10.3390/ijms15022991>
- Eissing, L., Scherer, T., Tödter, K., Knippschild, U., Greve, J. W., Buurman, W. A., Pinnschmidt, H. O., Rensen, S. S., Wolf, A. M., Bartelt, A., Heeren, J., Buettner, C., & Scheja, L. (2013). De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- $\beta$  and metabolic health. *Nat Commun*, 4, 1528.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms2537>
- Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N., & Levy, R. (2008, Sep). Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res*, 49(9), 1894-1903. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800132-JLR200>
- Endres, K. J., Hill, J. A., Lu, K., Foster, M. D., & Wesdemiotis, C. (2018, 2018/11/20). Surface Layer Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging: A Surface Imaging Technique for the Molecular-Level Analysis of Synthetic Material Surfaces. *Analytical Chemistry*, 90(22), 13427-13433.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03238>
- English, J. T., Patel, S. K., & Flanagan, M. J. (1973). Association of Pheochromocytomas with Brown Fat Tumors. *Radiology*, 107(2), 279-281.  
<https://doi.org/10.1148/107.2.279>
- Esteve Ràfols, M. (2014, 2014/02/01/). Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinología y Nutrición*, 61(2), 100-112.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>
- Etherton, T. D. (2000, Nov). The biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning. *J Nutr*, 130(11), 2623-2625.  
<https://doi.org/10.1093/jn/130.11.2623>
- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., & Subramaniam, S. (2011, Nov). Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta*, 1811(11), 637-647.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.009>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R. H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M. J. O., & Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl(Suppl), S9-S14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>
- Falkenburger, B. H., Jensen, J. B., Dickson, E. J., Suh, B.-C., & Hille, B. (2010). Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *The Journal of*

- physiology*, 588(Pt 17), 3179-3185.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.192153>
- Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., & Chen, J. (2001). Phosphatidic Acid-Mediated Mitogenic Activation of mTOR Signaling. *Science*, 294(5548), 1942. <https://doi.org/10.1126/science.1066015>
- Farooqi, I. S. (2014). Defining the neural basis of appetite and obesity: from genes to behaviour. *Clinical Medicine*, 14(3), 286.  
<https://doi.org/10.7861/clinmedicine.14-3-286>
- Farooqi, I. S., Jebb, S. A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C. H., Prentice, A. M., Hughes, I. A., McCamish, M. A., & O'Rahilly, S. (1999, Sep 16). Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med*, 341(12), 879-884. <https://doi.org/10.1056/nejm199909163411204>
- Farooqi, I. S., & O'Rahilly, S. (2014, Oct). 20 years of leptin: human disorders of leptin action. *J Endocrinol*, 223(1), T63-70. <https://doi.org/10.1530/joe-14-0480>
- Feenstra, A. D., Alexander, L. E., Song, Z., Korte, A. R., Yandea-Nelson, M. D., Nikolau, B. J., & Lee, Y. J. (2017). Spatial Mapping and Profiling of Metabolite Distributions during Germination. *Plant Physiology*, 174(4), 2532-2548.  
<https://doi.org/10.1104/pp.17.00652>
- Ferré, P., & Foulfelle, F. (2007). SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm Res*, 68(2), 72-82. <https://doi.org/10.1159/000100426>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957, May). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509.
- Fontaine, K. R., Redden, D. T., Wang, C., Westfall, A. O., & Allison, D. B. (2003). Years of Life Lost Due to Obesity. *JAMA*, 289(2), 187-193.  
<https://doi.org/10.1001/jama.289.2.187>
- Fournelle, F., Yang, E., Dufresne, M., & Chaurand, P. (2020, 2020/04/07). Minimizing Visceral Fat Delocalization on Tissue Sections with Porous Aluminum Oxide Slides for Imaging Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 92(7), 5158-5167.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05665>
- Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J. A., Fernández, S., & Rodríguez, A. (2014, Jun). Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev*, 27(1), 63-93. <https://doi.org/10.1017/s095442241400002x>
- Fuchs, B. (2014, Feb). Mass spectrometry and inflammation--MS methods to study oxidation and enzyme-induced changes of phospholipids. *Anal Bioanal Chem*, 406(5), 1291-1306. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7534-5>

- Fuchs, B., & Schiller, J. (2009, 2009/01/01). Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(1), 83-98. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800223>
- Furey, A., Moriarty, M., Bane, V., Kinsella, B., & Lehane, M. (2013, 2013/10/15/). Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta*, 115, 104-122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.048>
- Garrett, T. J., Prieto-Conaway, M. C., Kovtoun, V., Bui, H., Izgarian, N., Stafford, G., & Yost, R. A. (2007, 2007/02/01/). Imaging of small molecules in tissue sections with a new intermediate-pressure MALDI linear ion trap mass spectrometer. *International Journal of Mass Spectrometry*, 260(2), 166-176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijms.2006.09.019>
- Gault, C. R., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol*, 688, 1-23. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_1)
- Gault, C. R., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2010). An Overview of Sphingolipid Metabolism: From Synthesis to Breakdown. In *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules* (pp. 1-23). [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_1)
- Gebai, A., Gorelik, A., Li, Z., Illes, K., & Nagar, B. (2018, 2018/04/24). Structural basis for the activation of acid ceramidase. *Nature Communications*, 9(1), 1621. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03844-2>
- Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019, 2019/04/01). Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(4), 242-258. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>
- Godzien, J., Ciborowski, M., Whiley, L., Legido-Quigley, C., Ruperez, F. J., & Barbas, C. (2013, 2013/08/23/). In-vial dual extraction liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to streptozotocin-treated diabetic rats. Tips and pitfalls of the method. *Journal of Chromatography A*, 1304, 52-60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.029>
- González-Granillo, M., Helguero, L. A., Alves, E., Archer, A., Savva, C., Pedrelli, M., Ahmed, O., Li, X., Domingues, M. R., Parini, P., Gustafsson, J.-Å., & Korach-André, M. (2019, 2019/02/26). Sex-specific lipid molecular signatures in obesity-associated metabolic dysfunctions revealed by lipidomic characterization in ob/ob mouse. *Biology of Sex Differences*, 10(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13293-019-0225-y>
- Goodwin, R. J. A. (2012, Aug 30). Sample preparation for mass spectrometry imaging: small mistakes can lead to big consequences. *J Proteomics*, 75(16), 4893-4911. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.012>



- Goodwin, R. J. A. (2012, 2012/08/30/). Sample preparation for mass spectrometry imaging: Small mistakes can lead to big consequences. *Journal of Proteomics*, 75(16), 4893-4911. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.012>
- Goodwin, R. J. A., Nilsson, A., Borg, D., Langridge-Smith, P. R. R., Harrison, D. J., Mackay, C. L., Iverson, S. L., & Andrén, P. E. (2012, 2012/08/30/). Conductive carbon tape used for support and mounting of both whole animal and fragile heat-treated tissue sections for MALDI MS imaging and quantitation. *Journal of Proteomics*, 75(16), 4912-4920. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.07.006>
- Gordon, S. (2003, 2003/01/01). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 3(1), 23-35. <https://doi.org/10.1038/nri978>
- Goto, T., Lee, J. Y., Teraminami, A., Kim, Y. I., Hirai, S., Uemura, T., Inoue, H., Takahashi, N., & Kawada, T. (2011, May). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. *J Lipid Res*, 52(5), 873-884. <https://doi.org/10.1194/jlr.M011320>
- Gross, D. A., & Silver, D. L. (2014, Jul-Aug). Cytosolic lipid droplets: from mechanisms of fat storage to disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 49(4), 304-326. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.931337>
- Growth Hormone and the Mobilization of Fatty Acids. (1960). In *Ciba Foundation Symposium - Human Pituitary Hormones (Colloquia on Endocrinology)* (pp. 89-105). <https://doi.org/10.1002/9780470719183.ch6>
- Grzybek, M., Palladini, A., Alexaki, V. I., Surma, M. A., Simons, K., Chavakis, T., Klose, C., & Coskun, Ü. (2019, 2019/04/01/). Comprehensive and quantitative analysis of white and brown adipose tissue by shotgun lipidomics. *Molecular Metabolism*, 22, 12-20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.01.009>
- Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V., & Czech, M. P. (2008, May). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(5), 367-377. <https://doi.org/10.1038/nrm2391>
- Guzmán-Ruiz, R., Tercero-Alcázar, C., Rabanal-Ruiz, Y., Díaz-Ruiz, A., El Bekay, R., Rangel-Zuñiga, O. A., Navarro-Ruiz, M. C., Molero, L., Membrives, A., Ruiz-Rabelo, J. F., Pandit, A., López-Miranda, J., Tinahones, F. J., & Malagón, M. M. (2020). Adipose tissue depot-specific intracellular and extracellular cues contributing to insulin resistance in obese individuals. *The FASEB Journal*, 34(6), 7520-7539. <https://doi.org/10.1096/fj.201902703R>
- Hackstadt, A. J., & Hess, A. M. (2009, 2009/01/08). Filtering for increased power for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-11>

- Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., Kratky, D., Wagner, E. F., Klingenspor, M., Hoefler, G., & Zechner, R. (2006, May 5). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science*, 312(5774), 734-737. <https://doi.org/10.1126/science.1123965>
- Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T. M., Wagner, E. F., & Zechner, R. (2002, Feb 15). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem*, 277(7), 4806-4815. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110355200>
- Hahnel, D., Thiery, J., Brosche, T., & Engelmann, B. (1999, Oct). Role of plasmalogens in the enhanced resistance of LDL to copper-induced oxidation after LDL apheresis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(10), 2431-2438. <https://doi.org/10.1161/01.atv.19.10.2431>
- Hair, J. F., Sarstedt, M., Ringle, C. M., & Mena, J. A. (2012, 2012/05/01). An assessment of the use of partial least squares structural equation modeling in marketing research. *Journal of the Academy of Marketing Science*, 40(3), 414-433. <https://doi.org/10.1007/s11747-011-0261-6>
- Hakomori, S., & Igarashi, Y. (1995, Dec). Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J Biochem*, 118(6), 1091-1103. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124992>
- Hall, Z., Bond, N. J., Ashmore, T., Sanders, F., Ament, Z., Wang, X., Murray, A. J., Bellafante, E., Virtue, S., Vidal-Puig, A., Allison, M., Davies, S. E., Koulman, A., Vacca, M., & Griffin, J. L. (2017). Lipid zonation and phospholipid remodeling in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 65(4), 1165-1180. <https://doi.org/10.1002/hep.28953>
- Hammarstedt, A., Gogg, S., Hedjazifar, S., Nerstedt, A., & Smith, U. (2018). Impaired Adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity. *Physiological Reviews*, 98(4), 1911-1941. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2017>
- Han, X. (2016, 2016/11/01). Lipidomics for studying metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(11), 668-679. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.98>
- Han, X., & Gross, R. W. (2003, Jun). Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res*, 44(6), 1071-1079. <https://doi.org/10.1194/jlr.R300004-JLR200>



- Han, X., & Gross, R. W. (2005, Apr). Shotgun lipidomics: multidimensional MS analysis of cellular lipidomes. *Expert Rev Proteomics*, 2(2), 253-264. <https://doi.org/10.1586/14789450.2.2.253>
- Han, X., Yang, K., & Gross, R. W. (2012). Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses. *Mass Spectrometry Reviews*, 31(1), 134-178. <https://doi.org/10.1002/mas.20342>
- Hankin, J. A., Barkley, R. M., & Murphy, R. C. (2007, Sep). Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *J Am Soc Mass Spectrom*, 18(9), 1646-1652. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.06.010>
- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2018, 2018/03/01). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(3), 175-191. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.107>
- Hardy, O. T., Perugini, R. A., Nicolero, S. M., Gallagher-Dorval, K., Puri, V., Straubhaar, J., & Czech, M. P. (2011, Jan-Feb). Body mass index-independent inflammation in omental adipose tissue associated with insulin resistance in morbid obesity. *Surg Obes Relat Dis*, 7(1), 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2010.05.013>
- Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. (2017). *New England Journal of Medicine*, 377(1), 13-27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614362>
- Hebebrand, J., Volckmar, A. L., Knoll, N., & Hinney, A. (2010). Chipping Away the 'Missing Heritability': GIANT Steps Forward in the Molecular Elucidation of Obesity – but Still Lots to Go. *Obesity Facts*, 3(5), 294-303. <https://doi.org/10.1159/000321537>
- Heilbronn, L., Smith, S. R., & Ravussin, E. (2004, Dec). Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 28 Suppl 4, S12-21. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802853>
- Henseler, J., Ringle Christian, M., & Sinkovics Rudolf, R. (2009). The use of partial least squares path modeling in international marketing. In R. S. Rudolf & N. G. Pervez (Eds.), *New Challenges to International Marketing* (Vol. 20, pp. 277-319). Emerald Group Publishing Limited. [https://doi.org/10.1108/S1474-7979\(2009\)0000020014](https://doi.org/10.1108/S1474-7979(2009)0000020014)
- Henstridge, D., & Bozaoglu, K. (2017). The Omics of Obesity. In. <https://doi.org/10.5772/65942>
- Hepler, C., & Gupta, R. K. (2017, Apr 15). The expanding problem of adipose depot remodeling and postnatal adipocyte progenitor recruitment. *Mol Cell Endocrinol*, 445, 95-108. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.011>

- Herman, M. A., Peroni, O. D., Villoria, J., Schön, M. R., Abumrad, N. A., Blüher, M., Klein, S., & Kahn, B. B. (2012, Apr 19). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature*, 484(7394), 333-338. <https://doi.org/10.1038/nature10986>
- Heymsfield, S. B., & Wadden, T. A. (2017). Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *New England Journal of Medicine*, 376(3), 254-266. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1514009>
- Hodson, L., & Gunn, P. J. (2019, 2019/12/01). The regulation of hepatic fatty acid synthesis and partitioning: the effect of nutritional state. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(12), 689-700. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0256-9>
- Hong, J. H., Kang, J. W., Kim, D. K., Baik, S. H., Kim, K. H., Shanta, S. R., Jung, J. H., Mook-Jung, I., & Kim, K. P. (2016, Jan). Global changes of phospholipids identified by MALDI imaging mass spectrometry in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Lipid Res*, 57(1), 36-45. <https://doi.org/10.1194/jlr.M057869>
- Honsho, M., & Fujiki, Y. (2017, Sep). Plasmalogen homeostasis - regulation of plasmalogen biosynthesis and its physiological consequence in mammals. *FEBS Lett*, 591(18), 2720-2729. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12743>
- Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J. F., & Holthuis, J. C. (2004a). Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *The EMBO Journal*, 23(1), 33-44. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600034>
- Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J. F. H. M., & Holthuis, J. C. M. (2004b, 2004/01/14). Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *The EMBO Journal*, 23(1), 33-44. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600034>
- Huizing, L. R. S., Ellis, S. R., Beulen, B. W. A. M. M., Barré, F. P. Y., Kwant, P. B., Vreeken, R. J., & Heeren, R. M. A. (2019, 2019/04/01/). Development and evaluation of matrix application techniques for high throughput mass spectrometry imaging of tissues in the clinic. *Clinical Mass Spectrometry*, 12, 7-15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinms.2019.01.004>
- Hummel, J., Segu, S., Li, Y., Irgang, S., Jueppner, J., & Giavalisco, P. (2011). Ultra performance liquid chromatography and high resolution mass spectrometry for the analysis of plant lipids. *Front Plant Sci*, 2, 54. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00054>
- Huttunen, P., Hirvonen, J., & Kinnula, V. (1981). The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 46(4), 339-345. <https://doi.org/10.1007/bf00422121>
- Huynh, K., Barlow, C. K., Jayawardana, K. S., Weir, J. M., Mellett, N. A., Cinel, M., Magliano, D. J., Shaw, J. E., Drew, B. G., & Meikle, P. J. (2019). High-Throughput

- Plasma Lipidomics: Detailed Mapping of the Associations with Cardiometabolic Risk Factors. *Cell Chemical Biology*, 26(1), 71-84.e74. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.10.008>
- Iacobini, C., Pugliese, G., Blasetti Fantauzzi, C., Federici, M., & Menini, S. (2019, Mar). Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metabolism*, 92, 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.009>
- Irie, M., Fujimura, Y., Yamato, M., Miura, D., & Wariishi, H. (2014, 2014/06/01). Integrated MALDI-MS imaging and LC-MS techniques for visualizing spatiotemporal metabolomic dynamics in a rat stroke model. *Metabolomics*, 10(3), 473-483. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0588-8>
- Islinger, M., Godinho, L., Costello, J., & Schrader, M. (2015, 2015-September-25). The different facets of organelle interplay—an overview of organelle interactions [Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(56). <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00056>
- Jimenez-Gomez, Y., Mattison, Julie A., Pearson, Kevin J., Martin-Montalvo, A., Palacios, Hector H., Sossong, Alex M., Ward, Theresa M., Younts, Caitlin M., Lewis, K., Allard, Joanne S., Longo, Dan L., Belman, Jonathan P., Malagon, Maria M., Navas, P., Sanghvi, M., Moaddel, R., Tilmont, Edward M., Herbert, Richard L., Morrell, Christopher H., Egan, Josephine M., Baur, Joseph A., Ferrucci, L., Bogan, Jonathan S., Bernier, M., & de Cabo, R. (2013). Resveratrol Improves Adipose Insulin Signaling and Reduces the Inflammatory Response in Adipose Tissue of Rhesus Monkeys on High-Fat, High-Sugar Diet. *Cell metabolism*, 18(4), 533-545. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.004>
- Joe, F. H. J., Sarstedt, M., Hopkins, L., & Volker, G. K. (2014). Partial least squares structural equation modeling (PLS-SEM): An emerging tool in business research. *European Business Review*, 26(2), 106-121. <https://doi.org/10.1108/EBR-10-2013-0128>
- Jové, M., Moreno-Navarrete, J. M., Pamplona, R., Ricart, W., Portero-Otín, M., & Fernández-Real, J. M. (2014, 2014/03/01). Human omental and subcutaneous adipose tissue exhibit specific lipidomic signatures. *The FASEB Journal*, 28(3), 1071-1081. <https://doi.org/10.1096/fj.13-234419>
- Jurchen, J. C., Rubakhin, S. S., & Sweedler, J. V. (2005, Oct). MALDI-MS imaging of features smaller than the size of the laser beam. *J Am Soc Mass Spectrom*, 16(10), 1654-1659. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.06.006>
- Kahn, C. R., Wang, G., & Lee, K. Y. (2019, 10/01/). Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(10), 3990-4000. <https://doi.org/10.1172/JCI129187>

- Kane, H., & Lynch, L. (2019). Innate Immune Control of Adipose Tissue Homeostasis. *Trends in Immunology*, 40(9), 857-872. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.07.006>
- Kayser, B. D., Prifti, E., Lhomme, M., Belda, E., Dao, M.-C., Aron-Wisnewsky, J., Cotillard, A., Kennedy, S. P., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Galleron, N., Batto, J.-M., Renault, P., Ehrlich, S. D., Blottière, H., Leclerc, M., de Wouters, T., Lepage, P., Doré, J., Kontush, A., Zucker, J.-D., Rizkalla, S. W., Dugail, I., Clément, K., & Consortium, M. I.-O. (2019, 2019/10/11). Elevated serum ceramides are linked with obesity-associated gut dysbiosis and impaired glucose metabolism. *Metabolomics*, 15(11), 140. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1596-0>
- Kenwood, B. M., & Merrill, A. H. (2016). Lipidomics. In R. A. Bradshaw & P. D. Stahl (Eds.), *Encyclopedia of Cell Biology* (pp. 147-159). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.10024-0>
- Kersten, S. (2014, Jul). Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta*, 1841(7), 919-933. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2014.03.013>
- Khan, S., & Wang, C. H. (2014, Nov). ER stress in adipocytes and insulin resistance: mechanisms and significance (Review). *Mol Med Rep*, 10(5), 2234-2240. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2532>
- Khatib-Shahidi, S., Andersson, M., Herman, J. L., Gillespie, T. A., & Caprioli, R. M. (2006, 2006/09/01). Direct Molecular Analysis of Whole-Body Animal Tissue Sections by Imaging MALDI Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 78(18), 6448-6456. <https://doi.org/10.1021/ac060788p>
- Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T. F., Dragun, D., Skurk, T., Hauner, H., Blüher, M., Unger, T., Wolf, A. M., Knippschild, U., Hombach, V., & Marx, N. (2008, Jul). T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(7), 1304-1310. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.108.165100>
- Kishimoto, K., Urade, R., Ogawa, T., & Moriyama, T. (2001, Mar 2). Nondestructive quantification of neutral lipids by thin-layer chromatography and laser-fluorescent scanning: suitable methods for "lipidome" analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 281(3), 657-662. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4404>
- Klötting, N., Fasshauer, M., Dietrich, A., Kovacs, P., Schön, M. R., Kern, M., Stumvoll, M., & Blüher, M. (2010, Sep). Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299(3), E506-515. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00586.2009>

- Köfeler, H. C., Fauland, A., Rechberger, G. N., & Trötzlmüller, M. (2012, Jan 5). Mass spectrometry based lipidomics: an overview of technological platforms. *Metabolites*, 2(1), 19-38. <https://doi.org/10.3390/metabo2010019>
- Kolak, M., Gertow, J., Westerbacka, J., Summers, S. A., Liska, J., Franco-Cereceda, A., Orešič, M., Yki-Järvinen, H., Eriksson, P., & Fisher, R. M. (2012, 2012/09/13). Expression of ceramide-metabolising enzymes in subcutaneous and intra-abdominal human adipose tissue. *Lipids in Health and Disease*, 11(1), 115. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-115>
- Kolak, M., Westerbacka, J., Velagapudi, V. R., Wågsäter, D., Yetukuri, L., Makkonen, J., Rissanen, A., Häkkinen, A.-M., Lindell, M., Bergholm, R., Hamsten, A., Eriksson, P., Fisher, R. M., Orešič, M., & Yki-Järvinen, H. (2007). Adipose Tissue Inflammation and Increased Ceramide Content Characterize Subjects With High Liver Fat Content Independent of Obesity. *Diabetes*, 56(8), 1960. <https://doi.org/10.2337/db07-0111>
- König, S. (2008, 2008/02/01). Target coatings and desorption surfaces in biomolecular MALDI-MS. *PROTEOMICS*, 8(4), 706-714. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700782>
- Korte, A. R., Yandea-Nelson, M. D., Nikolau, B. J., & Lee, Y. J. (2015, Mar). Subcellular-level resolution MALDI-MS imaging of maize leaf metabolites by MALDI-linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer. *Anal Bioanal Chem*, 407(8), 2301-2309. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8460-5>
- Kory, N., Farese, R. V., Jr., & Walther, T. C. (2016, Jul). Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets. *Trends Cell Biol*, 26(7), 535-546. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.007>
- Koster, A., Stenholm, S., Alley, D. E., Kim, L. J., Simonsick, E. M., Kanaya, A. M., Visser, M., Houston, D. K., Nicklas, B. J., Tylavsky, F. A., Satterfield, S., Goodpaster, B. H., Ferrucci, L., & Harris, T. B. (2010, Dec). Body fat distribution and inflammation among obese older adults with and without metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*, 18(12), 2354-2361. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.86>
- Kuriyama, H., Shimomura, I., Kishida, K., Kondo, H., Furuyama, N., Nishizawa, H., Maeda, N., Matsuda, M., Nagaretani, H., Kihara, S., Nakamura, T., Tochino, Y., Funahashi, T., & Matsuzawa, Y. (2002, Oct). Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes*, 51(10), 2915-2921. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.10.2915>
- Kwok, K. H., Lam, K. S., & Xu, A. (2016, Mar 11). Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med*, 48(3), e215. <https://doi.org/10.1038/emmm.2016.5>

- Lackey, D. E., & Olefsky, J. M. (2016, Jan). Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol*, 12(1), 15-28. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.189>
- Lafontan, M. (2008, Dec). Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)*, 32 Suppl 7, S39-51. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.237>
- Lafontan, M., & Langin, D. (2009, Sep). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*, 48(5), 275-297. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.05.001>
- Lamaze, C., Tardif, N., Dewulf, M., Vassilopoulos, S., & Blouin, C. M. (2017, 2017/08/01/). The caveolae dress code: structure and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 47, 117-125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.014>
- Langin, D. (2006, Jun). Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res*, 53(6), 482-491. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.03.009>
- Lapid, K., & Graff, J. M. (2017, Jul 3). Form(ul)ation of adipocytes by lipids. *Adipocyte*, 6(3), 176-186. <https://doi.org/10.1080/21623945.2017.1299298>
- Lee, G. K., Lee, H. S., Park, Y. S., Lee, J. H., Lee, S. C., Lee, J. H., Lee, S. J., Shanta, S. R., Park, H. M., Kim, H. R., Kim, I. H., Kim, Y. H., Zo, J. I., Kim, K. P., & Kim, H. K. (2012, May). Lipid MALDI profile classifies non-small cell lung cancers according to the histologic type. *Lung Cancer*, 76(2), 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.10.016>
- Leopold, J., Popkova, Y., Engel, K. M., & Schiller, J. (2018a). Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Lipids. *Biomolecules*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/biom8040173>
- Leopold, J., Popkova, Y., Engel, K. M., & Schiller, J. (2018b). Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Lipids. *Biomolecules*, 8(4), 173. <https://www.mdpi.com/2218-273X/8/4/173>
- Letexier, D., Pinteaur, C., Large, V., Fréring, V., & Beylot, M. (2003, November 1, 2003). Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *Journal of Lipid Research*, 44(11), 2127-2134. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300235-JLR200>
- Li, S., Zhang, Y., Liu, J. a., Han, J., Guan, M., Yang, H., Lin, Y., Xiong, S., & Zhao, Z. (2016, 2016/11/25). Electrospray deposition device used to precisely control the matrix crystal to improve the performance of MALDI MSI. *Scientific Reports*, 6(1), 37903. <https://doi.org/10.1038/srep37903>



- Li, Z., Zhang, H., Liu, J., Liang, C. P., Li, Y., Li, Y., Teitelman, G., Beyer, T., Bui, H. H., Peake, D. A., Zhang, Y., Sanders, P. E., Kuo, M. S., Park, T. S., Cao, G., & Jiang, X. C. (2011, Oct). Reducing plasma membrane sphingomyelin increases insulin sensitivity. *Mol Cell Biol*, 31(20), 4205-4218. <https://doi.org/10.1128/mcb.05893-11>
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science*, 327(5961), 46-50. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>
- Liu, J., Lu, W., Shi, B., Klein, S., & Su, X. (2019, 2019/06/01/). Peroxisomal regulation of redox homeostasis and adipocyte metabolism. *Redox Biology*, 24, 101167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101167>
- Liu, K.-d., Acharjee, A., Hinz, C., Liggi, S., Murgia, A., Denes, J., Gulston, M. K., Wang, X., Chu, Y., West, J. A., Glen, R. C., Roberts, L. D., Murray, A. J., & Griffin, J. L. (2020, 2020/07/09). Consequences of Lipid Remodeling of Adipocyte Membranes Being Functionally Distinct from Lipid Storage in Obesity. *Journal of Proteome Research*. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00894>
- Lodhi, I. J., Yin, L., Jensen-Urstad, A. P. L., Funai, K., Coleman, T., Baird, J. H., El Ramahi, M. K., Razani, B., Song, H., Fu-Hsu, F., Turk, J., & Semenkovich, C. F. (2012). Inhibiting adipose tissue lipogenesis reprograms thermogenesis and PPAR $\gamma$  activation to decrease diet-induced obesity. *Cell metabolism*, 16(2), 189-201. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.013>
- Longuespée, R., Casadonte, R., Kriegsmann, M., Pottier, C., Picard de Muller, G., Delvenne, P., Kriegsmann, J., & De Pauw, E. (2016). MALDI mass spectrometry imaging: A cutting-edge tool for fundamental and clinical histopathology. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 10(7), 701-719. <https://doi.org/10.1002/prca.201500140>
- López-Bascón, M. A., Calderón-Santiago, M., Sánchez-Ceinos, J., Fernández-Vega, A., Guzmán-Ruiz, R., López-Miranda, J., Malagon, M. M., & Priego-Capote, F. (2018, 2018/01/15/). Influence of sample preparation on lipidomics analysis of polar lipids in adipose tissue. *Talanta*, 177, 86-93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.017>
- López-Villar, E., Martos-Moreno, G. Á., Chowen, J. A., Okada, S., Kopchick, J. J., & Argente, J. (2015, 2015/07/01). A proteomic approach to obesity and type 2 diabetes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(7), 1455-1470. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12600>
- Lu, J., Zhao, J., Meng, H., & Zhang, X. (2019, 2019-May-22). Adipose Tissue-Resident Immune Cells in Obesity and Type 2 Diabetes [Review]. *Frontiers in Immunology*, 10(1173). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01173>
- Lumeng, C. N., Deyoung, S. M., & Saltiel, A. R. (2007, Jan). Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport

- proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292(1), E166-174. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00284.2006>
- Malagón, M. M., Díaz-Ruiz, A., Guzmán-Ruiz, R., Jiménez-Gómez, Y., Moreno, N. R., García-Navarro, S., Vázquez-Martínez, R., & Peinado, J. R. (2013, Nov). Adipobiology for novel therapeutic approaches in metabolic syndrome. *Curr Vasc Pharmacol*, 11(6), 954-967. <https://doi.org/10.2174/15701611113116660170>
- Mamtani, M., Meikle, P. J., Kulkarni, H., Weir, J. M., Barlow, C. K., Jowett, J. B., Bellis, C., Dyer, T. D., Almasy, L., Mahaney, M. C., Duggirala, R., Comuzzie, A. G., Blangero, J., & Curran, J. E. (2014, Mar). Plasma dihydroceramide species associate with waist circumference in Mexican American families. *Obesity (Silver Spring)*, 22(3), 950-956. <https://doi.org/10.1002/oby.20598>
- Mankidy, R., Ahiahonu, P. W. K., Ma, H., Jayasinghe, D., Ritchie, S. A., Khan, M. A., Su-Myat, K. K., Wood, P. L., & Goodenowe, D. B. (2010, 2010/06/14). Membrane plasmalogen composition and cellular cholesterol regulation: a structure activity study. *Lipids in Health and Disease*, 9(1), 62. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-62>
- Manna, P., & Jain, S. K. (2015, 2015/12/01). Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 13(10), 423-444. <https://doi.org/10.1089/met.2015.0095>
- Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A., & Brasaemle, D. L. (2006, Apr 28). The phosphorylation of serine 492 of perilipin directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J Biol Chem*, 281(17), 11901-11909. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600171200>
- Mathieu, P., Poirier, P., Pibarot, P., Lemieux, I., & Després, J. P. (2009, Apr). Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension*, 53(4), 577-584. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.108.110320>
- Matsuda, M., & Shimomura, I. (2013, 2013/09/01/). Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity Research & Clinical Practice*, 7(5), e330-e341. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.orcp.2013.05.004>
- Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T. V., Shevchenko, A., & Schwudke, D. (2008, May). Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res*, 49(5), 1137-1146. <https://doi.org/10.1194/jlr.D700041-JLR200>



- Maximus, P. S., Al Achkar, Z., Hamid, P. F., Hasnain, S. S., & Peralta, C. A. (2020, Sep). Adipocytokines: Are they the Theory of Everything? *Cytokine*, 133, 155144. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155144>
- Meikle, P. J., & Summers, S. A. (2017, 2017/02/01). Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(2), 79-91. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.169>
- Messier, V., Karelis, A. D., Prud'homme, D., Primeau, V., Brochu, M., & Rabasa-Lhoret, R. (2010, May). Identifying metabolically healthy but obese individuals in sedentary postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring)*, 18(5), 911-917. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.364>
- Mitsutake, S., & Igarashi, Y. (2013). Chapter Twelve - Sphingolipids in Lipid Microdomains and Obesity. In G. Litwack (Ed.), *Vitamins & Hormones* (Vol. 91, pp. 271-284). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407766-9.00012-2>
- Mitsutake, S., Zama, K., Yokota, H., Yoshida, T., Tanaka, M., Mitsui, M., Ikawa, M., Okabe, M., Tanaka, Y., Yamashita, T., Takemoto, H., Okazaki, T., Watanabe, K., & Igarashi, Y. (2011, Aug 12). Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes. *J Biol Chem*, 286(32), 28544-28555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.255646>
- Molica, F., Morel, S., Kwak, B. R., Rohner-Jeanrenaud, F., & Steffens, S. (2015, Mar). Adipokines at the crossroad between obesity and cardiovascular disease. *Thromb Haemost*, 113(3), 553-566. <https://doi.org/10.1160/th14-06-0513>
- Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., Sewter, C. P., Digby, J. E., Mohammed, S. N., Hurst, J. A., Cheetham, C. H., Earley, A. R., Barnett, A. H., Prins, J. B., & O'Rahilly, S. (1997, 1997/06/01). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387(6636), 903-908. <https://doi.org/10.1038/43185>
- Moreno-Castellanos, N., Guzmán-Ruiz, R., Cano, D. A., Madrazo-Atutxa, A., Peinado, J. R., Pereira-Cunill, J. L., García-Luna, P. P., Morales-Conde, S., Socas-Macias, M., Vázquez-Martínez, R., Leal-Cerro, A., & Malagón, M. M. (2016, Aug). The Effects of Bariatric Surgery-Induced Weight Loss on Adipose Tissue in Morbidly Obese Women Depends on the Initial Metabolic Status. *Obes Surg*, 26(8), 1757-1767. <https://doi.org/10.1007/s11695-015-1995-x>
- Moro, C., Galitzky, J., Sengenès, C., Crampes, F., Lafontan, M., & Berlan, M. (2004, Mar). Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 308(3), 984-992. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.060913>

- Mottillo, E. P., Bloch, A. E., Leff, T., & Granneman, J. G. (2012, Jul 20). Lipolytic products activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  and  $\delta$  in brown adipocytes to match fatty acid oxidation with supply. *J Biol Chem*, 287(30), 25038-25048. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374041>
- Mousa, A., Naderpoor, N., Mellett, N., Wilson, K., Plebanski, M., Meikle, P. J., & de Courten, B. (2019, 2019/03/01/). Lipidomic profiling reveals early-stage metabolic dysfunction in overweight or obese humans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(3), 335-343. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.12.014>
- Murray, S., Tulloch, A., Gold, M. S., & Avena, N. M. (2014, 2014/09/01). Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(9), 540-552. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.91>
- Navas-Iglesias, N., Carrasco-Pancorbo, A., & Cuadros-Rodríguez, L. (2009, 2009/04/01/). From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(4), 393-403. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.12.004>
- Nilsson, A., Goodwin, R. J., Shariatgorji, M., Vallianatou, T., Webborn, P. J., & Andrén, P. E. (2015, Feb 3). Mass spectrometry imaging in drug development. *Anal Chem*, 87(3), 1437-1455. <https://doi.org/10.1021/ac504734s>
- Nimesh, S., Mohottalage, S., Vincent, R., & Kumarathasan, P. (2013). Current Status and Future Perspectives of Mass Spectrometry Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/ijms140611277>
- Norris, J. L., & Caprioli, R. M. (2013, 2013/04/10). Analysis of Tissue Specimens by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry in Biological and Clinical Research. *Chemical Reviews*, 113(4), 2309-2342. <https://doi.org/10.1021/cr3004295>
- Novelle, M. G., Vázquez, M. J., Peinado, J. R., Martinello, K. D., López, M., Luckman, S. M., Tena-Sempere, M., Malagón, M. M., Nogueiras, R., & Diéguez, C. (2017, 2017/04/07). Sequential Exposure to Obesogenic Factors in Females Rats: From Physiological Changes to Lipid Metabolism in Liver and Mesenteric Adipose Tissue. *Scientific Reports*, 7(1), 46194. <https://doi.org/10.1038/srep46194>
- Nyberg, S. T., Batty, G. D., Pentti, J., Virtanen, M., Alfredsson, L., Fransson, E. I., Goldberg, M., Heikkilä, K., Jokela, M., Knutsson, A., Koskenvuo, M., Lallukka, T., Leineweber, C., Lindbohm, J. V., Madsen, I. E. H., Magnusson Hanson, L. L., Nordin, M., Oksanen, T., Pietiläinen, O., Rahkonen, O., Rugulies, R., Shipley, M. J., Stenholm, S., Suominen, S., Theorell, T., Vahtera, J., Westerholm, P. J. M., Westerlund, H., Zins, M., Hamer, M., Singh-Manoux, A., Bell, J. A., Ferrie, J. E., &

- Kivimäki, M. (2018, 2018/10/01/). Obesity and loss of disease-free years owing to major non-communicable diseases: a multicohort study. *The Lancet Public Health*, 3(10), e490-e497. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(18\)30139-7](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(18)30139-7)
- O'Brien, R. M., & Granner, D. K. (1996, Oct). Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev*, 76(4), 1109-1161. <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.4.1109>
- O'Connell, J., Lynch, L., Cawood, T. J., Kwasnik, A., Nolan, N., Geoghegan, J., McCormick, A., O'Farrelly, C., & O'Shea, D. (2010, Apr 1). The relationship of omental and subcutaneous adipocyte size to metabolic disease in severe obesity. *PLOS ONE*, 5(4), e9997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009997>
- Ogorodnikova, A. D., Khan, U. I., McGinn, A. P., Zeb, I., Budoff, M. J., Harman, S. M., Miller, V. M., Brinton, E. A., Manson, J. E., Hodis, H. N., Merriam, G. R., Cedars, M. I., Taylor, H. S., Naftolin, F., Lobo, R. A., Santoro, N., & Wildman, R. P. (2013). Ectopic fat and adipokines in metabolically benign overweight/obese women: The kronos early estrogen prevention study. *Obesity*, 21(8), 1726-1733. <https://doi.org/10.1002/oby.20200>
- Okosun, I. S., Seale, J. P., & Lyn, R. (2015, 2015/05/01). Commingling effect of gynoid and android fat patterns on cardiometabolic dysregulation in normal weight American adults. *Nutrition & Diabetes*, 5(5), e155-e155. <https://doi.org/10.1038/nutd.2015.5>
- Olzmann, J. A., & Carvalho, P. (2019, 2019/03/01). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 137-155. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>
- Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019, 2019-May-24). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages [Review]. *Frontiers in Immunology*, 10(1084). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>
- Orsoni, A., Thérond, P., Tan, R., Giral, P., Robillard, P., Kontush, A., Meikle, P. J., & Chapman, M. J. (2016, Nov). Statin action enriches HDL3 in polyunsaturated phospholipids and plasmalogens and reduces LDL-derived phospholipid hydroperoxides in atherogenic mixed dyslipidemia. *J Lipid Res*, 57(11), 2073-2087. <https://doi.org/10.1194/jlr.P068585>
- Oussaada, S. M., van Galen, K. A., Cooman, M. I., Kleinendorst, L., Hazebroek, E. J., van Haelst, M. M., ter Horst, K. W., & Serlie, M. J. (2019). The pathogenesis of obesity. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 92, 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.12.012>
- Pagliassotti, M. J., Kim, P. Y., Estrada, A. L., Stewart, C. M., & Gentile, C. L. (2016, Sep). Endoplasmic reticulum stress in obesity and obesity-related disorders: An

- expanded view. *Metabolism*, 65(9), 1238-1246. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.05.002>
- Parton, R. G., Del Pozo, M. A., Vassilopoulos, S., Nabi, I. R., Le Lay, S., Lundmark, R., Kenworthy, A. K., Camus, A., Blouin, C. M., Sessa, W. C., & Lamaze, C. (2020, Jan). Caveolae: The FAQs. *Traffic*, 21(1), 181-185. <https://doi.org/10.1111/tra.12689>
- Passarelli, M. K., & Ewing, A. G. (2013, Oct). Single-cell imaging mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*, 17(5), 854-859. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.07.017>
- Peinado, J. R., Diaz-Ruiz, A., Frühbeck, G., & Malagon, M. M. (2014, 2014/03/01). Mitochondria in metabolic disease: Getting clues from proteomic studies. *PROTEOMICS*, 14(4-5), 452-466. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300376>
- Pellegrinelli, V., Carobbio, S., & Vidal-Puig, A. (2016, 2016/06/01). Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia*, 59(6), 1075-1088. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3933-4>
- Pellegrinelli, V., Carobbio, S., & Vidal-Puig, A. (2016, Jun). Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia*, 59(6), 1075-1088. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3933-4>
- Perry, W. J., Patterson, N. H., Prentice, B. M., Neumann, E. K., Caprioli, R. M., & Spraggins, J. M. (2020, 2020/04/01). Uncovering matrix effects on lipid analyses in MALDI imaging mass spectrometry experiments. *Journal of Mass Spectrometry*, 55(4), e4491. <https://doi.org/10.1002/jms.4491>
- Phillips, C. M. (2016). Metabolically Healthy Obesity: Personalised and Public Health Implications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(4), 189-191. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.02.001>
- Phillips, C. M., & Perry, I. J. (2013). Does Inflammation Determine Metabolic Health Status in Obese and Nonobese Adults? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(10), E1610-E1619. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2038>
- Pietiläinen, K. H., Sysi-Aho, M., Rissanen, A., Seppänen-Laakso, T., Yki-Järvinen, H., Kaprio, J., & Oresic, M. (2007, Feb 14). Acquired obesity is associated with changes in the serum lipidomic profile independent of genetic effects--a monozygotic twin study. *PLOS ONE*, 2(2), e218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000218>
- Pietiläinen, K. H., Sysi-Aho, M., Rissanen, A., Seppänen-Laakso, T., Yki-Järvinen, H., Kaprio, J., & Orešič, M. (2007). Acquired Obesity Is Associated with Changes in the Serum Lipidomic Profile Independent of Genetic Effects – A Monozygotic Twin Study. *PLOS ONE*, 2(2), e218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000218>

- Primeau, V., Coderre, L., Karelis, A. D., Brochu, M., Lavoie, M. E., Messier, V., Sladek, R., & Rabasa-Lhoret, R. (2011, Jul). Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int J Obes (Lond)*, 35(7), 971-981. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.216>
- Prospective Studies, C. (2009). Body-mass index and cause-specific mortality in 900&#x2008;000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *The Lancet*, 373(9669), 1083-1096. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60318-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60318-4)
- Puolitaival, S. M., Burnum, K. E., Cornett, D. S., & Caprioli, R. M. (2008, Jun). Solvent-free matrix dry-coating for MALDI imaging of phospholipids. *J Am Soc Mass Spectrom*, 19(6), 882-886. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.02.013>
- Puolitaival, S. M., Burnum, K. E., Cornett, D. S., & Caprioli, R. M. (2008, 2008/06/01). Solvent-free matrix dry-coating for MALDI imaging of phospholipids. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(6), 882-886. <https://doi.org/10.1021/jasms.8b03205>
- Pyrina, I., Chung, K.-J., Michailidou, Z., Koutsilieris, M., Chavakis, T., & Chatzigeorgiou, A. (2020, 2020-July-14). Fate of Adipose Progenitor Cells in Obesity-Related Chronic Inflammation [Mini Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(644). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00644>
- Quehenberger, O., Armando, A. M., Brown, A. H., Milne, S. B., Myers, D. S., Merrill, A. H., Bandyopadhyay, S., Jones, K. N., Kelly, S., Shaner, R. L., Sullards, C. M., Wang, E., Murphy, R. C., Barkley, R. M., Leiker, T. J., Raetz, C. R., Guan, Z., Laird, G. M., Six, D. A., Russell, D. W., McDonald, J. G., Subramaniam, S., Fahy, E., & Dennis, E. A. (2010, Nov). Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res*, 51(11), 3299-3305. <https://doi.org/10.1194/jlr.M009449>
- Ramakrishnan, V. M., & Boyd, N. L. (2017, 2018/08/01). The Adipose Stromal Vascular Fraction as a Complex Cellular Source for Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 24(4), 289-299. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2017.0061>
- Rauschert, S., Uhl, O., Koletzko, B., Kirchberg, F., Mori, T. A., Huang, R.-C., Beilin, L. J., Hellmuth, C., & Oddy, W. H. (2016). Lipidomics Reveals Associations of Phospholipids With Obesity and Insulin Resistance in Young Adults. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(3), 871-879. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3525>
- Roberts, L. D., West, J. A., Vidal-Puig, A., & Griffin, J. L. (2014). Chapter Twelve - Methods for Performing Lipidomics in White Adipose Tissue. In O. A. MacDougald (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 538, pp. 211-231). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800280-3.00012-8>

- Roberts, L. D., West, J. A., Vidal-Puig, A., & Griffin, J. L. (2014). Methods for performing lipidomics in white adipose tissue. *Methods Enzymol*, 538, 211-231. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800280-3.00012-8>
- Rodríguez, A., Ezquerro, S., Méndez-Giménez, L., Becerril, S., & Frühbeck, G. (2015, Oct 15). Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 309(8), E691-714. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00297.2015>
- Rodríguez, A., Ezquerro, S., Méndez-Giménez, L., Becerril, S., & Frühbeck, G. (2015). Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 309(8), E691-E714. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00297.2015>
- Róg, T., & Vattulainen, I. (2014, Dec). Cholesterol, sphingolipids, and glycolipids: what do we know about their role in raft-like membranes? *Chem Phys Lipids*, 184, 82-104. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.10.004>
- Römpf, A., & Spengler, B. (2013, Jun). Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space. *Histochem Cell Biol*, 139(6), 759-783. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1097-6>
- Rosen, E. D. (2015, 2015/04/01). Two paths to fat. *Nature Cell Biology*, 17(4), 360-361. <https://doi.org/10.1038/ncb3133>
- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2006, 2006/12/01). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 444(7121), 847-853. <https://doi.org/10.1038/nature05483>
- Rosen, Evan D., & Spiegelman, Bruce M. (2014). What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell*, 156(1), 20-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>
- Rousseau, A., & Bertolotti, A. (2018, 2018/11/01). Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(11), 697-712. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0040-z>
- Ruiz-Gutiérrez, V., & Pérez-Camino, M. C. (2000, 2000/07/14/). Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *Journal of Chromatography A*, 885(1), 321-341. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00181-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00181-3)
- Russo, L., & Lumeng, C. N. (2018). Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology*, 155(4), 407-417. <https://doi.org/10.1111/imm.13002>



- Russo, S. B., Ross, J. S., & Cowart, L. A. (2013). Sphingolipids in obesity, type 2 diabetes, and metabolic disease. *Handbook of experimental pharmacology*(216), 373-401. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1511-4\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1511-4_19)
- Rustam, Y. H., & Reid, G. E. (2018, 2018/01/02). Analytical Challenges and Recent Advances in Mass Spectrometry Based Lipidomics. *Analytical Chemistry*, 90(1), 374-397. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04836>
- Sánchez-Garrido, M. A., Ruiz-Pino, F., Manfredi-Lozano, M., Leon, S., Heras, V., Castellano, J. M., Castaño, J. P., Luque, R. M., Vázquez, M. J., Roa, J., Romero-Ruiz, A., Diéguez, C., Pinilla, L., & Tena-Sempere, M. (2015). Metabolic and Gonadotropic Impact of Sequential Obesogenic Insults in the Female: Influence of the Loss of Ovarian Secretion. *Endocrinology*, 156(8), 2984-2998. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1951>
- Sandra, K., & Sandra, P. (2013, 2013/10/01/). Lipidomics from an analytical perspective. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(5), 847-853. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.010>
- Santos, A. L., & Preta, G. (2018, 2018/06/01). Lipids in the cell: organisation regulates function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(11), 1909-1927. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2765-4>
- Sarker, G., Litwan, K., Kastli, R., & Peleg-Raibstein, D. (2019, 2019/11/21). Maternal overnutrition during critical developmental periods leads to different health adversities in the offspring: relevance of obesity, addiction and schizophrenia. *Scientific Reports*, 9(1), 17322. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53652-x>
- Scherer, M., Montoliu, I., Qanadli, S. D., Collino, S., Rezzi, S., Kussmann, M., Giusti, V., & Martin, F. P. (2015, Jan). Blood plasma lipidomic signature of epicardial fat in healthy obese women. *Obesity (Silver Spring)*, 23(1), 130-137. <https://doi.org/10.1002/oby.20925>
- Scherer, P. E. (2019, 2019/02/01). The many secret lives of adipocytes: implications for diabetes. *Diabetologia*, 62(2), 223-232. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4777-x>
- Schipper, H. S., Prakken, B., Kalkhoven, E., & Boes, M. (2012). Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(8), 407-415. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.011>
- Schwamborn, K., Kriegsmann, M., & Weichert, W. (2017, 2017/07/01/). MALDI imaging mass spectrometry — From bench to bedside. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1865(7), 776-783. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.10.014>

- Ščupáková, K., Balluff, B., Tressler, C., Adelaja, T., Heeren, R. M. A., Glunde, K., & Ertaylan, G. (2020, Jun 25). Cellular resolution in clinical MALDI mass spectrometry imaging: the latest advancements and current challenges. *Clin Chem Lab Med*, 58(6), 914-929. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0858>
- Seppänen-Laakso, T., & Orešič, M. (2009, 01 Mar. 2009). How to study lipidomes. *Journal of Molecular Endocrinology*, 42(3), 185. <https://doi.org/10.1677/jme-08-0150>
- Shimma, S., & Sugiura, Y. (2014). Effective Sample Preparations in Imaging Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry*, 3(Special\_Issue), S0029-S0029. <https://doi.org/10.5702/massspectrometry.S0029>
- Shin, M. J., Hyun, Y. J., Kim, O. Y., Kim, J. Y., Jang, Y., & Lee, J. H. (2006, Oct). Weight loss effect on inflammation and LDL oxidation in metabolically healthy but obese (MHO) individuals: low inflammation and LDL oxidation in MHO women. *Int J Obes (Lond)*, 30(10), 1529-1534. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803304>
- Shobo, A., Baijnath, S., Bratkowska, D., Naiker, S., Somboro, A. M., Bester, L. A., Singh, S. D., Naicker, T., Kruger, H. G., & Govender, T. (2016, 2016/08/01). MALDI MSI and LC-MS/MS: Towards preclinical determination of the neurotoxic potential of fluoroquinolones. *Drug Testing and Analysis*, 8(8), 832-838. <https://doi.org/10.1002/dta.1862>
- Shuster, A., Patlas, M., Pinthus, J. H., & Mourtzakis, M. (2012). The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *The British journal of radiology*, 85(1009), 1-10. <https://doi.org/10.1259/bjr/38447238>
- Singh, G. M., Danaei, G., Farzadfar, F., Stevens, G. A., Woodward, M., Wormser, D., Kaptoge, S., Whitlock, G., Qiao, Q., Lewington, S., Di Angelantonio, E., vander Hoorn, S., Lawes, C. M. M., Ali, M. K., Mozaffarian, D., Ezzati, M., Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating, G., Asia-Pacific Cohort Studies, C., Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis of Diagnostic criteria in, E., Emerging Risk Factor, C., & Prospective Studies, C. (2013). The Age-Specific Quantitative Effects of Metabolic Risk Factors on Cardiovascular Diseases and Diabetes: A Pooled Analysis. *PLOS ONE*, 8(7), e65174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065174>
- Slawik, M., & Vidal-Puig, A. J. (2007, Oct). Adipose tissue expandability and the metabolic syndrome. *Genes Nutr*, 2(1), 41-45. <https://doi.org/10.1007/s12263-007-0014-9>
- Slotte, J. P., & Ramstedt, B. (2007, 2007/10/01). The functional role of sphingomyelin in cell membranes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(10), 977-981. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700024>
- Smolira, A., & Wessely-Szponder, J. (2015, 2015/02/01). Importance of the Matrix and the Matrix/Sample Ratio in MALDI-TOF-MS Analysis of Cathelicidins Obtained



- from Porcine Neutrophils. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(4), 2050-2065. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1405-1>
- Sokolowska, E., & Blachnio-Zabielska, A. (2019, 2019-August-21). The Role of Ceramides in Insulin Resistance [Review]. *Frontiers in Endocrinology*, 10(577). <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00577>
- Soriguer, F., Gutiérrez-Repiso, C., Rubio-Martín, E., García-Fuentes, E., Almaraz, M. C., Colomo, N., Esteva de Antonio, I., de Adana, M. S., Chaves, F. J., Morcillo, S., Valdés, S., & Rojo-Martínez, G. (2013, Jun). Metabolically healthy but obese, a matter of time? Findings from the prospective Pizarra study. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(6), 2318-2325. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-4253>
- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Rydén, M., Frisén, J., & Arner, P. (2008, 2008/06/01). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453(7196), 783-787. <https://doi.org/10.1038/nature06902>
- Speliotes, E. K., Willer, C. J., Berndt, S. I., Monda, K. L., Thorleifsson, G., Jackson, A. U., Lango Allen, H., Lindgren, C. M., Luan, J., Mägi, R., Randall, J. C., Vedantam, S., Winkler, T. W., Qi, L., Workalemahu, T., Heid, I. M., Steinthorsdottir, V., Stringham, H. M., Weedon, M. N., Wheeler, E., Wood, A. R., Ferreira, T., Weyant, R. J., Segrè, A. V., Estrada, K., Liang, L., Nemesh, J., Park, J. H., Gustafsson, S., Kilpeläinen, T. O., Yang, J., Bouatia-Naji, N., Esko, T., Feitosa, M. F., Kutalik, Z., Mangino, M., Raychaudhuri, S., Scherag, A., Smith, A. V., Welch, R., Zhao, J. H., Aben, K. K., Absher, D. M., Amin, N., Dixon, A. L., Fisher, E., Glazer, N. L., Goddard, M. E., Heard-Costa, N. L., Hoesel, V., Hottenga, J. J., Johansson, A., Johnson, T., Ketkar, S., Lamina, C., Li, S., Moffatt, M. F., Myers, R. H., Narisu, N., Perry, J. R., Peters, M. J., Preuss, M., Ripatti, S., Rivadeneira, F., Sandholt, C., Scott, L. J., Timpson, N. J., Tyrer, J. P., van Wingerden, S., Watanabe, R. M., White, C. C., Wiklund, F., Barlassina, C., Chasman, D. I., Cooper, M. N., Jansson, J. O., Lawrence, R. W., Pellikka, N., Prokopenko, I., Shi, J., Thiering, E., Alavere, H., Alibrandi, M. T., Almgren, P., Arnold, A. M., Aspelund, T., Atwood, L. D., Balkau, B., Balmforth, A. J., Bennett, A. J., Ben-Shlomo, Y., Bergman, R. N., Bergmann, S., Biebermann, H., Blakemore, A. I., Boes, T., Bonnycastle, L. L., Bornstein, S. R., Brown, M. J., Buchanan, T. A., Busonero, F., Campbell, H., Cappuccino, F. P., Cavalcanti-Proença, C., Chen, Y. D., Chen, C. M., Chines, P. S., Clarke, R., Coin, L., Connell, J., Day, I. N., den Heijer, M., Duan, J., Ebrahim, S., Elliott, P., Elosua, R., Eiriksdottir, G., Erdos, M. R., Eriksson, J. G., Facheris, M. F., Felix, S. B., Fischer-Posovszky, P., Folsom, A. R., Friedrich, N., Freimer, N. B., Fu, M., Gaget, S., Gejman, P. V., Geus, E. J., Gieger, C., Gjesing, A. P., Goel, A., Goyette, P., Grallert, H., Grässler, J., Greenawalt, D. M., Groves, C. J., Gudnason, V., Guiducci, C., Hartikainen, A. L., Hassanali, N., Hall, A. S., Havulinna, A. S., Hayward, C., Heath, A. C., Hengstenberg, C., Hicks, A. A., Hinney, A., Hofman, A., Homuth, G., Hui, J., Igl, W., Iribarren, C., Isomaa, B., Jacobs, K. B., Jarick, I., Jewell, E., John, U., Jørgensen, T., Jousilahti, P., Jula, A., Kaakinen, M., Kajantie, E., Kaplan, L. M.,

Kathiresan, S., Kettunen, J., Kinnunen, L., Knowles, J. W., Kolcic, I., König, I. R., Koskinen, S., Kovacs, P., Kuusisto, J., Kraft, P., Kvaløy, K., Laitinen, J., Lantieri, O., Lanzani, C., Launer, L. J., Lecoeur, C., Lehtimäki, T., Lettre, G., Liu, J., Lokki, M. L., Lorentzon, M., Luben, R. N., Ludwig, B., Manunta, P., Marek, D., Marre, M., Martin, N. G., McArdle, W. L., McCarthy, A., McKnight, B., Meitinger, T., Melander, O., Meyre, D., Midthjell, K., Montgomery, G. W., Morken, M. A., Morris, A. P., Mulic, R., Ngwa, J. S., Nelis, M., Neville, M. J., Nyholt, D. R., O'Donnell, C. J., O'Rahilly, S., Ong, K. K., Oostra, B., Paré, G., Parker, A. N., Perola, M., Pichler, I., Pietiläinen, K. H., Platou, C. G., Polasek, O., Pouta, A., Rafelt, S., Raitakari, O., Rayner, N. W., Ridderstråle, M., Rief, W., Ruukonen, A., Robertson, N. R., Rzehak, P., Salomaa, V., Sanders, A. R., Sandhu, M. S., Sanna, S., Saramies, J., Savolainen, M. J., Scherag, S., Schipf, S., Schreiber, S., Schunkert, H., Silander, K., Sinisalo, J., Siscovick, D. S., Smit, J. H., Soranzo, N., Sovio, U., Stephens, J., Surakka, I., Swift, A. J., Tammesoo, M. L., Tardif, J. C., Teder-Laving, M., Teslovich, T. M., Thompson, J. R., Thomson, B., Tönjes, A., Tuomi, T., van Meurs, J. B., van Ommen, G. J., Vatin, V., Viikari, J., Visvikis-Siest, S., Vitart, V., Vogel, C. I., Voight, B. F., Waite, L. L., Wallaschofski, H., Walters, G. B., Widen, E., Wiegand, S., Wild, S. H., Willemssen, G., Witte, D. R., Witterman, J. C., Xu, J., Zhang, Q., Zgaga, L., Ziegler, A., Zitting, P., Beilby, J. P., Farooqi, I. S., Hebebrand, J., Huikuri, H. V., James, A. L., Kähönen, M., Levinson, D. F., Macciardi, F., Nieminen, M. S., Ohlsson, C., Palmer, L. J., Ridker, P. M., Stumvoll, M., Beckmann, J. S., Boeing, H., Boerwinkle, E., Boomsma, D. I., Caulfield, M. J., Chanock, S. J., Collins, F. S., Cupples, L. A., Smith, G. D., Erdmann, J., Froguel, P., Grönberg, H., Gyllenstein, U., Hall, P., Hansen, T., Harris, T. B., Hattersley, A. T., Hayes, R. B., Heinrich, J., Hu, F. B., Hveem, K., Illig, T., Jarvelin, M. R., Kaprio, J., Karpe, F., Khaw, K. T., Kiemeny, L. A., Krude, H., Laakso, M., Lawlor, D. A., Metspalu, A., Munroe, P. B., Ouwehand, W. H., Pedersen, O., Penninx, B. W., Peters, A., Pramstaller, P. P., Quertermous, T., Reinehr, T., Rissanen, A., Rudan, I., Samani, N. J., Schwarz, P. E., Shuldiner, A. R., Spector, T. D., Tuomilehto, J., Uda, M., Uitterlinden, A., Valle, T. T., Wabitsch, M., Waeber, G., Wareham, N. J., Watkins, H., Wilson, J. F., Wright, A. F., Zillikens, M. C., Chatterjee, N., McCarroll, S. A., Purcell, S., Schadt, E. E., Visscher, P. M., Assimes, T. L., Borecki, I. B., Deloukas, P., Fox, C. S., Groop, L. C., Haritunians, T., Hunter, D. J., Kaplan, R. C., Mohlke, K. L., O'Connell, J. R., Peltonen, L., Schlessinger, D., Strachan, D. P., van Duijn, C. M., Wichmann, H. E., Frayling, T. M., Thorsteinsdottir, U., Abecasis, G. R., Barroso, I., Boehnke, M., Stefansson, K., North, K. E., McCarthy, M. I., Hirschhorn, J. N., Ingelsson, E., & Loos, R. J. (2010, Nov). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet*, 42(11), 937-948. <https://doi.org/10.1038/ng.686>

Spener, F., Lagarde, M., Gélouën, A., & Record, M. (2003). Editorial: What is lipidomics? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(9), 481-482. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390101>

Spengler, B. (2015, Jan 6). Mass spectrometry imaging of biomolecular information. *Anal Chem*, 87(1), 64-82. <https://doi.org/10.1021/ac504543v>

- Stefan, N., Kantartzis, K., Machann, J., Schick, F., Thamer, C., Rittig, K., Balletshofer, B., Machicao, F., Fritsche, A., & Häring, H. U. (2008, Aug 11). Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch Intern Med*, 168(15), 1609-1616. <https://doi.org/10.1001/archinte.168.15.1609>
- Stepanka, K., Pavel, C., Jiri, S., & Radovan, H. (2019, 01 May. 2019). Characterization of proteins in cultural heritage using MALDI-TOF and LC-MS/MS mass spectrometric techniques. *Physical Sciences Reviews*, 4(5), 20180011. <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/psr-2018-0011>
- Stephens, J. M. (2012). The Fat Controller: Adipocyte Development. *PLOS Biology*, 10(11), e1001436. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001436>
- Stienstra, R., Duval, C., Müller, M., & Kersten, S. (2007). PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res*, 2007, 95974. <https://doi.org/10.1155/2007/95974>
- Stoeckli, M., Chaurand, P., Hallahan, D. E., & Caprioli, R. M. (2001, Apr). Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med*, 7(4), 493-496. <https://doi.org/10.1038/86573>
- Strissel, K. J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J. W., 2nd, DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2007, Dec). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*, 56(12), 2910-2918. <https://doi.org/10.2337/db07-0767>
- Stunkard, A. J., Harris, J. R., Pedersen, N. L., & McClearn, G. E. (1990, May 24). The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med*, 322(21), 1483-1487. <https://doi.org/10.1056/nejm199005243222102>
- Su, X. Q., Wang, J., & Sinclair, A. J. (2019, 2019/04/16). Plasmalogens and Alzheimer's disease: a review. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1044-1>
- Sugiura, Y., Honda, K., & Suematsu, M. (2015). Development of an Imaging Mass Spectrometry Technique for Visualizing Localized Cellular Signaling Mediators in Tissues. *Mass Spectrometry*, 4(1), A0040-A0040. <https://doi.org/10.5702/massspectrometry.A0040>
- Sui, J., He, M., Wang, Y., Zhao, X., He, Y., & Shi, B. (2019, 2019/11/01). Sphingolipid metabolism in type 2 diabetes and associated cardiovascular complications. *Exp Ther Med*, 18(5), 3603-3614. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7981>
- Summers, S. A. (2006, Jan). Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res*, 45(1), 42-72. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.11.002>

- Sun, K., Tordjman, J., Clément, K., & Scherer, P. E. (2013, Oct 1). Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell metabolism*, 18(4), 470-477. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.016>
- Swierczynski, J., Goyke, E., Wach, L., Pankiewicz, A., Kochan, Z., Adamonis, W., Sledzinski, Z., & Aleksandrowicz, Z. (2000, 2000/05/01/). Comparative study of the lipogenic potential of human and rat adipose tissue. *Metabolism*, 49(5), 594-599. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(00\)80033-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0026-0495(00)80033-5)
- Takahashi, H., Sanada, K., Nagai, H., Li, Y., Aoki, Y., Ara, T., Seno, S., Matsuda, H., Yu, R., Kawada, T., & Goto, T. (2017, 2017/11/04/). Over-expression of PPAR $\alpha$  in obese mice adipose tissue improves insulin sensitivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(1), 108-114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.067>
- Takumi, K., Shimada, K., Iijima, N., & Ozawa, H. (2015, 2015/11/01/). Maternal high-fat diet during lactation increases Kiss1 mRNA expression in the arcuate nucleus at weaning and advances puberty onset in female rats. *Neuroscience Research*, 100, 21-28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.06.004>
- Tam, C. S., Xie, W., Johnson, W. D., Cefalu, W. T., Redman, L. M., & Ravussin, E. (2012). Defining Insulin Resistance From Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamps. *Diabetes Care*, 35(7), 1605-1610. <https://doi.org/10.2337/dc11-2339>
- Tchkonia, T., Tchoukalova, Y. D., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Karagiannides, I., Forse, R. A., Koo, A., Stevenson, M., Chinnappan, D., Cartwright, A., Jensen, M. D., & Kirkland, J. L. (2005, Jan). Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288(1), E267-277. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00265.2004>
- Tchoukalova, Y. D., Sarr, M. G., & Jensen, M. D. (2004, Nov). Measuring committed preadipocytes in human adipose tissue from severely obese patients by using adipocyte fatty acid binding protein. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287(5), R1132-1140. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00337.2004>
- Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J. M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., & Ihle, J. N. (1998, May 29). Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, 93(5), 841-850. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81444-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81444-0)
- Thomas, A., Charbonneau, J. L., Fournaise, E., & Chaurand, P. (2012, 2012/02/21). Sublimation of New Matrix Candidates for High Spatial Resolution Imaging Mass Spectrometry of Lipids: Enhanced Information in Both Positive and Negative Polarities after 1,5-Diaminonaphthalene Deposition. *Analytical Chemistry*, 84(4), 2048-2054. <https://doi.org/10.1021/ac2033547>

- Thomas, A., & Chaurand, P. (2014). Advances in tissue section preparation for MALDI imaging MS. *Bioanalysis*, 6(7), 967-982. <https://doi.org/10.4155/bio.14.63>
- Thompson, B. R., Lobo, S., & Bernlohr, D. A. (2010, Apr 29). Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Mol Cell Endocrinol*, 318(1-2), 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.08.015>
- Tonks, K. T., Coster, A. C., Christopher, M. J., Chaudhuri, R., Xu, A., Gagnon-Bartsch, J., Chisholm, D. J., James, D. E., Meikle, P. J., Greenfield, J. R., & Samocha-Bonet, D. (2016). Skeletal muscle and plasma lipidomic signatures of insulin resistance and overweight/obesity in humans. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 24(4), 908-916. <https://doi.org/10.1002/oby.21448>
- Touboul, D., Brunelle, A., & Laprévotte, O. (2011, Jan). Mass spectrometry imaging: Towards a lipid microscope? *Biochimie*, 93(1), 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.05.013>
- Tran, T. T., & Kahn, C. R. (2010, Apr). Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 6(4), 195-213. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.20>
- Turner, N., Kowalski, G. M., Leslie, S. J., Risis, S., Yang, C., Lee-Young, R. S., Babb, J. R., Meikle, P. J., Lancaster, G. I., Henstridge, D. C., White, P. J., Kraegen, E. W., Marette, A., Cooney, G. J., Febbraio, M. A., & Bruce, C. R. (2013, Jul). Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding. *Diabetologia*, 56(7), 1638-1648. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2913-1>
- Turpin-Nolan, S. M., & Brüning, J. C. (2020, 2020/04/01). The role of ceramides in metabolic disorders: when size and localization matters. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(4), 224-233. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0320-5>
- Ullah, R., Su, Y., Shen, Y., Li, C., Xu, X., Zhang, J., Huang, K., Rauf, N., He, Y., Cheng, J., Qin, H., Zhou, Y.-D., & Fu, J. (2017, 2017/06/01). Postnatal feeding with high-fat diet induces obesity and precocious puberty in C57BL/6J mouse pups: a novel model of obesity and puberty. *Frontiers of Medicine*, 11(2), 266-276. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0530-y>
- van Beek, L., Lips, M. A., Visser, A., Pijl, H., Ioan-Facsinay, A., Toes, R., Berends, F. J., Willems van Dijk, K., Koning, F., & van Harmelen, V. (2014, Apr). Increased systemic and adipose tissue inflammation differentiates obese women with T2DM from obese women with normal glucose tolerance. *Metabolism*, 63(4), 492-501. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.12.002>
- Van Nuffel, S., Elie, N., Yang, E., Nouet, J., Touboul, D., Chaurand, P., & Brunelle, A. (2018, 2018/02/06). Insights into the MALDI Process after Matrix Deposition by

- Sublimation Using 3D ToF-SIMS Imaging. *Analytical Chemistry*, 90(3), 1907-1914. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03993>
- Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., & Giralt, M. (2017, 2017/01/01). Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(1), 26-35. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.136>
- Virtue, S., & Vidal-Puig, A. (2010, 2010/03/01/). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome — An allostatic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(3), 338-349. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.12.006>
- Vishvanath, L., & Gupta, R. K. (2019, 10/01/). Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(10), 4022-4031. <https://doi.org/10.1172/JCI129191>
- Wajchenberg, B. L. (2000, Dec). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, 21(6), 697-738. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.6.0415>
- Wallner, S., & Schmitz, G. (2011, Sep). Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species. *Chem Phys Lipids*, 164(6), 573-589. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.008>
- Walther, T. C., & Farese, R. V., Jr. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem*, 81, 687-714. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430>
- Wanders, R., & Brites, P. (2010, 06/01). Biosynthesis of ether-phospholipids including plasmalogens, peroxisomes and human disease: New insights into an old problem. *Clinical Lipidology - CLIN LIPIDOL*, 5, 379-386. <https://doi.org/10.2217/clp.10.16>
- Wanders, R. J., Ferdinandusse, S., Brites, P., & Kemp, S. (2010, Mar). Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta*, 1801(3), 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.01.001>
- Wang, M., Wang, C., Han, R. H., & Han, X. (2016, Jan). Novel advances in shotgun lipidomics for biology and medicine. *Prog Lipid Res*, 61, 83-108. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.12.002>
- Wang, N., Liang, H., & Zen, K. (2014, 2014-November-28). Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance [Review]. *Frontiers in Immunology*, 5(614). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>
- Wang, S., Xiao, C., Li, Y., Ling, L., Chen, X., & Guo, X. (2017, 2017/03/01). A Surface Pattern on MALDI Steel Plate for One-Step In-Situ Self-Desalting and Enrichment



- of Peptides/Proteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(3), 428-433. <https://doi.org/10.1021/jasms.8b05494>
- Weir, J. M., Wong, G., Barlow, C. K., Greeve, M. A., Kowalczyk, A., Almasy, L., Comuzzie, A. G., Mahaney, M. C., Jowett, J. B., Shaw, J., Curran, J. E., Blangero, J., & Meikle, P. J. (2013, Oct). Plasma lipid profiling in a large population-based cohort. *J Lipid Res*, 54(10), 2898-2908. <https://doi.org/10.1194/jlr.P035808>
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr. (2003, Dec). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112(12), 1796-1808. <https://doi.org/10.1172/jci19246>
- Wentworth, J. M., Naselli, G., Ngui, K., Smyth, G. K., Liu, R., O'Brien, P. E., Bruce, C., Weir, J., Cinel, M., Meikle, P. J., & Harrison, L. C. (2016, Apr). GM3 ganglioside and phosphatidylethanolamine-containing lipids are adipose tissue markers of insulin resistance in obese women. *Int J Obes (Lond)*, 40(4), 706-713. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.223>
- Weyer, C., Foley, J. E., Bogardus, C., Tataranni, P. A., & Pratley, R. E. (2000, 2000/11/01). Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts Type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia*, 43(12), 1498-1506. <https://doi.org/10.1007/s001250051560>
- Whiley, L., Godzien, J., Ruperez, F. J., Legido-Quigley, C., & Barbas, C. (2012, Jul 17). In-vial dual extraction for direct LC-MS analysis of plasma for comprehensive and highly reproducible metabolic fingerprinting. *Anal Chem*, 84(14), 5992-5999. <https://doi.org/10.1021/ac300716u>
- Whitworth, N. S., & Meeks, R. G. (1985). Hormone Metabolism: Body Weight and Extraglandular Estrogen Production. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 28(3), 580-587. [https://journals.lww.com/clinicalobgyn/Fulltext/1985/28030/Hormone\\_Metabolism\\_Body\\_Weight\\_and\\_Extraglandular.14.aspx](https://journals.lww.com/clinicalobgyn/Fulltext/1985/28030/Hormone_Metabolism_Body_Weight_and_Extraglandular.14.aspx)
- Wiangnon, K., & Cramer, R. (2015, 2015/02/03). Sample Preparation: A Crucial Factor for the Analytical Performance of Rationally Designed MALDI Matrices. *Analytical Chemistry*, 87(3), 1485-1488. <https://doi.org/10.1021/ac504412p>
- Wilfling, F., Wang, H., Haas, J. T., Krahmer, N., Gould, T. J., Uchida, A., Cheng, J. X., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F., Liu, X., Buhman, K. K., Coleman, R. A., Bewersdorf, J., Farese, R. V., Jr., & Walther, T. C. (2013, Feb 25). Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocating from the ER to lipid droplets. *Dev Cell*, 24(4), 384-399. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.013>
- Xu, S., Zhang, X., & Liu, P. (2018, 2018/05/01/). Lipid droplet proteins and metabolic diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*,

- 1864(5, Part B), 1968-1983.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.019>
- Xu, X. J., Gauthier, M. S., Hess, D. T., Apovian, C. M., Cacicedo, J. M., Gokce, N., Farb, M., Valentine, R. J., & Ruderman, N. B. (2012, Apr). Insulin sensitive and resistant obesity in humans: AMPK activity, oxidative stress, and depot-specific changes in gene expression in adipose tissue. *J Lipid Res*, 53(4), 792-801.  
<https://doi.org/10.1194/jlr.P022905>
- Yang, G., Badeanlou, L., Bielawski, J., Roberts, A. J., Hannun, Y. A., & Samad, F. (2009, Jul). Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(1), E211-224. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.91014.2008>
- Yang, J., & Caprioli, R. M. (2014). Matrix pre-coated targets for high throughput MALDI imaging of proteins. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(5), 417-422.  
<https://doi.org/10.1002/jms.3354>
- Yang, K., Cheng, H., Gross, R. W., & Han, X. (2009, 2009/06/01). Automated Lipid Identification and Quantification by Multidimensional Mass Spectrometry-Based Shotgun Lipidomics. *Analytical Chemistry*, 81(11), 4356-4368.  
<https://doi.org/10.1021/ac900241u>
- Yanovski, J. A. (2018, 2018/01/01). Trends in underweight and obesity — scale of the problem. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(1), 5-6.  
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.157>
- Yetukuri, L., Katajamaa, M., Medina-Gomez, G., Seppänen-Laakso, T., Vidal-Puig, A., & Orešič, M. (2007, 2007/02/15). Bioinformatics strategies for lipidomics analysis: characterization of obesity related hepatic steatosis. *BMC Systems Biology*, 1(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-1-12>
- Ying, L., Tippetts, T. S., & Chaurasia, B. (2019). Ceramide dependent lipotoxicity in metabolic diseases. *Nutrition and Healthy Aging*, 5, 1-12.  
<https://doi.org/10.3233/NHA-170032>
- Zacharia, A., Saidenberg, D., Mannully, C. T., Kogan, N. M., Shehadeh, A., Sinai, R., Zucker, A., Bruck-Haimson, R., Goldstein, N., Haim, Y., Dani, C., Rudich, A., & Moussaieff, A. (2020). Distinct infrastructure of lipid networks in visceral and subcutaneous adipose tissues in overweight humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa195>
- Zavalin, A., Todd, E. M., Rawhouser, P. D., Yang, J., Norris, J. L., & Caprioli, R. M. (2012). Direct imaging of single cells and tissue at sub-cellular spatial resolution using transmission geometry MALDI MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(11), 1473-1481. <https://doi.org/10.1002/jms.3108>



- Zechner, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Lass, A., & Zimmermann, R. (2005, Jun). Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidol*, 16(3), 333-340. <https://doi.org/10.1097/01.mol.0000169354.20395.1c>
- Zemski Berry, K. A., Hankin, J. A., Barkley, R. M., Spraggins, J. M., Caprioli, R. M., & Murphy, R. C. (2011, 2011/10/12). MALDI Imaging of Lipid Biochemistry in Tissues by Mass Spectrometry. *Chemical Reviews*, 111(10), 6491-6512. <https://doi.org/10.1021/cr200280p>
- Zhang, C., Klett, E. L., & Coleman, R. A. (2013, Dec). Lipid signals and insulin resistance. *Clin Lipidol*, 8(6), 659-667. <https://doi.org/10.2217/clp.13.67>
- Zhang, C., Wendel, A. A., Keogh, M. R., Harris, T. E., Chen, J., & Coleman, R. A. (2012). Glycerolipid signals alter mTOR complex 2 (mTORC2) to diminish insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), 1667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110730109>
- Zhang, Y., Li, L., Yang, P., & Lu, H. (2012). On-plate enrichment methods for MALDI-MS analysis in proteomics [10.1039/C2AY25510C]. *Analytical Methods*, 4(9), 2622-2631. <https://doi.org/10.1039/C2AY25510C>
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994, 1994/12/01). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425-432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>
- Zhao, Y.-Y., Miao, H., Cheng, X.-L., & Wei, F. (2015, 2015/10/05/). Lipidomics: Novel insight into the biochemical mechanism of lipid metabolism and dysregulation-associated disease. *Chemico-Biological Interactions*, 240, 220-238. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.09.005>
- Zheng, C., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Liu, K., Shou, P., Qian, F., Wang, Y., & Shi, Y. (2016). Local proliferation initiates macrophage accumulation in adipose tissue during obesity. *Cell death & disease*, 7(3), e2167-e2167. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.54>
- Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., & Zechner, R. (2004, Nov 19). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 306(5700), 1383-1386. <https://doi.org/10.1126/science.1100747>
- Zmora, N., Bashirdes, S., Levy, M., & Elinav, E. (2017, Mar 7). The Role of the Immune System in Metabolic Health and Disease. *Cell metabolism*, 25(3), 506-521. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.02.006>

Züllig, T., Trötz Müller, M., & Köfeler, H. C. (2020, 2020/04/01). Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(10), 2191-2209. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02241-y>